

PLASMA - FIBRONEKTIN :

Konzentrationsbestimmung bei extrakorporaler Zirkulation

(unter Berücksichtigung der Evaluierung

verschiedener Nachweismethoden).

AXEL SCHRAMM

1986

Ans der Abteilung für Klassische Philologie und
Klassische Archäologie an der Universität
Wien, Institut für den Bereich der
Klassischen Philologie, Wien, 1910.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie in der Chirurgischen
Klinik Innenstadt der Universität München
Leitung: Prof. Dr. H. Fritz

P l a s m a - F i b r o n e k t i n :
Konzentrationsbestimmung bei extrakorpora-
ler Zirkulation (unter Berücksichtigung der
Evaluierung verschiedener Nachweismethoden).

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Axel Schramm

München
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Fritz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Knedel
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.1986	

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A EINLEITUNG

1

B MATERIAL UND METHODEN

10

1. Material

10

1.1. Untersuchungsmaterial

10

1.2. Chemikalien

13

1.3. Geräte

14

2. Methoden

15

2.1. Immunelektrophoresen

15

2.1.1. Rocket-Immunelektrophorese

15

2.1.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese

17

2.1.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese -

18

Intermediärgeltechnik

2.2. Immundiffusion nach Mancini

20

2.2.1. Selbstgefertigte Gele

20

2.2.2. LC-Partigenplatten

21

2.3. Turbidimetrischer Immunoassay

22

2.4. Untersuchungen zur Präzision

24

C ERGEBNISSE

26

1. Vorversuche

26

1.1. Rocket-Immunelektrophorese

26

1.1.1. Elektrophoresebedingungen

26

1.1.2. Eichkurve

29

1.1.3. Probenvorbereitung

32

1.1.4. Einfluß von Fibrinogen, Aprotinin,

33

C1-Inhibitor, Heparin und Protamin-
chlorid auf den Fibronektinnachweis

	Seite
1.1.5. Untersuchungen zur Präzision	35
1.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese	38
1.2.1. Vergleich: Normalplasma-Proteinstandard- plasma-gereinigtes Fibronektin	38
1.2.2. Einfluß von Heparin	40
1.2.3. Einfluß von Fibrinogen	43
1.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese - Intermediärgeltechnik	45
1.3.1. Fibrinogen-Antiserum im Zwischengel	45
1.3.2. Fibronektin-Antiserum im Zwischengel	48
1.3.3. Einfluß von Heparin	49
1.3.4. Einfluß von Fibrinogen	55
1.4. Immundiffusion nach Mancini	57
1.4.1. Vergleich: Selbstgefertigte Gele - LC-Partigenplatten	57
1.4.2. Untersuchungen zur Präzision	59
1.5. Turbidimetrischer Immunoassay	62
1.5.1. Eichkurve	62
1.5.2. Untersuchungen zur Präzision	62
1.6. Testbedingungen für die Hauptversuche	65
 2. Hauptversuche	 66
2.1. Fibronektinkonzentration bei extrakorporaler Zirkulation	66
2.1.1. Aprotinin-Gruppe	66
2.1.2. Placebo-Gruppe	69
2.1.3. C1-Inhibitor-Gruppe	71

	Seite
2.2. Korrelationsberechnungen	73
2.2.1. Aprotinin-Gruppe	73
2.2.2. Placebo-Gruppe	77
2.2.3. C1-Inhibitor-Gruppe	81
2.3. Vergleich: Gesamtprotein und Fibronectin- konzentration	85
2.3.1. Aprotinin-Gruppe	85
2.3.2. Placebo-Gruppe	87
2.3.3. C1-Inhibitor-Gruppe	88
2.3.4. Korrigierte Fibronectinwerte	91
 D DISKUSSION	 95
 E ZUSAMMENFASSUNG	 104
 F LITERATURVERZEICHNIS	 106

Abkürzungen

Apr.	Aprotinin
C1	C1-Inhibitor
ClG	kälteunlösliches Globulin
CSP	cell surface fibronectin
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
E	Einheit
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IE	internationale Einheit
KIE	Kallikrein-Inhibitor-Einheit
LETS	large external transformation sensitive protein
LC	low concentration
NaCl	Natriumchlorid
Prot.-Chl.	Protaminchlorid
RES	Retikuloendotheliales System
Tricine	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

A. EINLEITUNG

Das retikuloendotheliale System (RES) spielt bei Abwehrfunktionen des Körpers gegen Infektionen, Intoxikationen, Tumoren und Polytraumen eine bedeutende Rolle. Dies beruht hauptsächlich auf seiner Fähigkeit zur Phagozytose fremder und pathologischer körpereigener Substanzen (4,43,47). An der Phagozytose durch Zellen des RES (Kupffer-Zellen) oder durch Makrophagen sind Glykoproteine als Vermittler und Membranrezeptoren beteiligt (42). Speziell nachgewiesen wurden solche Mediatorfunktionen für das "opsonic- α_2 -oberflächenbindende Glykoprotein" (SB) oder Plasma-Fibronektin (3,46).

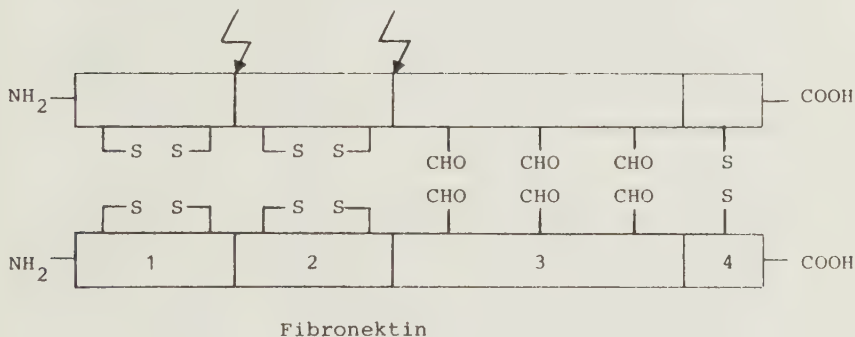
Fibronektin tritt in zwei unterschiedlichen Formen auf: löslich und frei zirkulierend findet man es in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Blut, Lymphe und Gewebeflüssigkeiten (5,29,32,55), während es als unlösliches, gebundenes Protein in den Bindegeweben, an Basalmembranen und verschiedenen Zelloberflächen nachgewiesen wurde (27). Der größte Teil des Fibronektins wird von Hepatozyten gebildet, jedoch sind auch Bindegewebszellen, Makrophagen und Endothelzellen zur Produktion befähigt. Die meisten dieser Zellen können es sowohl freisetzen als auch wieder aufnehmen (1,13,27,40,61).

Das hochmolekulare Glykoprotein wurde erstmals von Morrison (26) isoliert und "kälteunlösliches Globulin" (ClG) genannt, entsprechend seiner spezifischen Eigenschaft,

einen nicht-kovalenten, in der Kälte unlöslichen Komplex mit Fibrinogen zu bilden (38). Die heute am häufigsten gebrauchte Bezeichnung Fibronectin leitet sich von "Fibra = Faser" und "nectere = binden, vernetzen" ab. Demnach wird Fibronectin als Bindungs- oder Anheftungsprotein gedeutet, mit der Fähigkeit, fibrilläre Moleküle miteinander zu vernetzen. Darüberhinaus finden sich jedoch auch zahlreiche weitere Synonyma in der Literatur: die lösliche Form wurde bisher als "opsonic- α_2 -surface-binding-(SB)-glycoprotein", "Kälteunlösliches Globulin" (CIG), "humoraler Erkennungsfaktor" oder "Plasma-Fibronectin" bezeichnet. Für das Gewebefibronectin werden auch "large external transformation sensitive (LETS) protein", "Galactoprotein A", "cell-surface-fibronectin" (CSP) oder "soluble fibroblast protein" benutzt (8,12,28,41,59).

Die Bezeichnung Fibronectin wird recht häufig für beide Formen verwendet, obwohl dies nicht ganz exakt erscheint. Zwar sind beide Molekülarten strukturell ähnlich und immunologisch nicht zu unterscheiden, wandern elektrophoretisch in der β -Fraktion (3,22) und besitzen gleiche antigene Determinanten; sie weisen jedoch geringfügige Unterschiede in der Molekularstruktur auf und zeigen ein unterschiedliches physiologisches Verhalten (47,61). Fibronectin ist ein komplexes Molekül mit einem Molekulargewicht von 440 - 450 000 Dalton und besteht aus zwei ähnlichen, durch Disulfidbrücken verbundenen Unter-

einheiten von jeweils 220 - 230 000 Dalton (Abb. 1). Es besitzt eine hohe Affinität zu denaturiertem Kollagen, Fibrin, Fibrinogen, Aktin, Heparin und Staphylococcus aureus ebenso wie zu Oberflächen von Phagozytosezellen und Fibroblasten (28,35).



Region	M _r	Affinität zu
1	25 - 30 000	Staph. aureus, Heparin, Fibrin
2	30 - 40 000	Fibrin, Kollagen, Aktin
3	140 - 150 000	Heparin, Zellanheftung
4	6 - 10 000	---



Proteasen

Abb. 1: Schematische Darstellung des Fibronektinmoleküls nach Saba (44).

Bindungsstudien von Hörmann und Mitarbeitern (14,15) haben gezeigt, daß Fibrinogen und Fibronektin bei 4°C an denaturiertes Kollagen binden; bei 20°C bleibt nur noch Fibronektin gebunden, das bei 37°C auch abgelöst werden kann. Während die Affinität zu denaturiertem Kollagen III sehr hoch ist, erfolgt die Bindung an natives Kollagen III nur in geringem Umfang; sie kann jedoch durch Heparin beträchtlich gesteigert werden, während andere Mucopolysaccharide inaktiv sind oder als Inhibitoren (z.B. Hyaluronsäure) dieser Reaktion wirken. Gar keine Reaktion findet mit nativem Kollagen I oder II statt. Die Wirkung von Heparin beruht möglicherweise auf einer Umwandlung von löslichem Fibronektin in fibrilläre Strukturen, die eine höhere Affinität zu den stäbchenförmigen Kollagenmolekülen zeigen. Aufgrund dieser unterschiedlichen funktionellen Bereiche und bisher festgestellter Reaktionen des Proteins bei verschiedensten Erkrankungen wurde dem Gewebefibronektin die Bedeutung als Anheftungs- oder Strukturglykoprotein, dem zirkulierenden Plasmafibronektin die Aufgabe des opsonin-Glykoproteins zugeschrieben (47).

Der Normalbereich für zirkulierendes Fibronektin im Plasma wird mit Konzentrationen zwischen 240 und 400 µg/ml angegeben; Einzelwerte liegen jedoch zwischen 180 und 800 µg/ml. Männer besitzen höhere Plasmafibronektinspiegel als Frauen, wobei bisher nicht geklärt ist, ob dieser Unterschied vom Körpergewicht, der Knochenmasse, dem

Bindegewebe oder dem Hormonhaushalt abhängt; ebenso unklar ist, auf welchem Mechanismus der Proteinanstieg im Alter beruht (6,29,38). Im Serum finden sich wesentlich niedrigere Werte als im Plasma. Dies wird durch die kovalente Bindung von Fibronektin an Fibrin über den fibrinstabilisierenden Faktor XIII a während des Gerinnungsprozesses verursacht. Die Konzentrationsabnahme ist besonders ausgeprägt, wenn das Blut in der Kälte gerinnt (6,52).

Die kovalente Bindung von Fibronektin an Fibrin spielt auch eine bedeutende Rolle bei der Wundheilung. Im Granulationsgewebe ist Fibronektin früh nachweisbar; hier bewirkt es die Fibroblastenadhäsion an das Kollagen. Fehlt Fibronektin, so wird die Einsprossung des Fibroblasten verzögert, wenn nicht gar verhindert, so daß eine fehlerhafte Wundheilung auftritt (2,14,15,28,31). Darüberhinaus sorgt Fibronektin durch das Einwandern in sich bildende Blutgerinnsel für die bindegewebige Organisation von Thromben (26). Bei einer gesteigerten intravasalen Gerinnung entstehen Fibrinmonomere, die eine weitere Aktivierung der Gerinnung nach sich ziehen. Diese Fibrinmonomerkomplexe werden durch die Vermittlung von Fibronektin vom RES phagozytiert. Nachgewiesen werden konnte, daß eine verminderte Konzentration dieses Glykoproteins eine Verbrauchskoagulopathie verstärken kann. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß bei Erkrankungen mit disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) ein gesteiger-

ter Verbrauch und eine verminderte Bildung durch Hepatozyten bestand (26,30). Eine herabgesetzte Produktion fand man ebenfalls bei allen Leberparenchymerkrankungen, während bei Patienten mit chronisch persistierender oder chronisch aktiver Hepatitis, primärer biliärer Zirrhose oder auch mit einer alkoholischen Fettleber der Plasmaproteinspiegel im Normbereich lag (9). Die Bedeutung des Fibronektins für die Phagozytosefähigkeit des retikuloendothelialen Systems wurde bereits erwähnt. So bedingt eine verminderte Konzentration des Glykoproteins eine geschwächte RES-Funktion (4,19,23,42,43,49). Sehr gründlich untersucht wurde dies nach ausgedehnten Operationen, Traumen und Verbrennungen mit nachfolgender Sepsis. In vielen Fällen ist jedoch unklar, ob die herabgesetzte Proteinkonzentration durch eine gestörte Synthese oder durch einen verstärkten Verbrauch über die Bindung an Fibrinmonomerkomplexe, Mikroaggregate, Bakterien bzw. Endotoxine entsteht (34). Für die Mikrothrombosierung der Lungenkapillaren scheint allerdings ein gesteigerter Verbrauch verantwortlich zu sein, als dessen Folge Mikroaggregate bei herabgesetzter Clearance-Funktion des RES ungehindert in die Lunge gelangen und letztendlich zu einer Schocklunge führen können (22,47). Die eingeschränkte RES-Funktion scheint auch durch die verminderte Clearance u.a. von Endotoxinen aus der Darmflora gewisse Nierenfunktionsstörungen zu bewirken. Andererseits wurden bei Patienten mit nephrotischem Syndrom erhöhte

Fibronektinwerte gefunden (7,62), wahrscheinlich bedingt durch eine verminderte Elimination des großmolekularen Proteins (hierzu gehört auch Fibrinogen).

Bei allen Erkrankungen mit vermindertem Fibronektin-
spiegel konnte eine überraschende Verbesserung im Krank-
heitsverlauf - bei Sepsis sogar in der Überlebensrate -
durch Substitution mit Kryoglobulin erzielt werden;
diese Plasmafraktion enthält hauptsächlich Fibronektin
(34,44,45). Schließlich sei noch erwähnt, daß sich ver-
schiedene Veröffentlichungen auch mit der Möglichkeit
eines Einflusses von Fibronektin auf die Pathogenese
maligner Tumoren (54,55) und deren Metastasierung (56,58)
sowie der Beteiligung des Glycoproteins bei embryonalen
Differenzierungsprozessen (38) beschäftigen.

Aufgabenstellung

Die in den letzten Jahren sprunghaft gestiegene Zahl an Untersuchungen zu Eigenschaften und Funktionen des Fibronektins spiegeln klar die Bedeutung wider, die diesem Glykoprotein zunehmend unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen beigemessen wird.

Da lebenswichtige Interaktionen zwischen Fibronektin und dem Gerinnungs- bzw. Fibrinolyse-System gut belegt sind (36,38,51,58), war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, den Konzentrationsverlauf von Plasmafibronektin bei Patienten mit extrakorporaler Zirkulation zu verfolgen, um Rückschlüsse auf eine eventuelle Beteiligung dieses Proteins an den nichtchirurgisch bedingten Blutungskomplikationen nach Eingriffen am offenen Herzen ziehen zu können. In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse, daß es bei Verwendung der Herz-Lungenmaschine (HLM) offensichtlich zu einer vermehrten Aktivierung und Freisetzung von proteolytischen Enzymen (Plasmin, Kallikrein, lysosomale Proteasen etc.) kommt, als deren Folge ein gesteigerter Verbrauch von Plasmaproteinen durch unspezifische Proteolyse diskutiert wird (16,21,33). Durch eine gezielte antiproteolytische Therapie sollte daher bei zwei weiteren Patientenkollektiven mit dem als potenten Plasmin/Kallikrein-Inhibitor bekannten Aprotinin bzw. dem Kallikrein/C1-Esterase Hemmstoff C1-Inhibitor eine klinisch relevante Verbesserung des Hämostasepotentials erreicht werden. Da Plasmafibronektin in vitro als sehr

sensitives Substrat für Plasmin angesehen wird (11), haben wir untersucht, ob die Wirksamkeit der Inhibitortherapie möglicherweise auch an einem im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe unterschiedlichen Konzentrationsverlauf des Fibronektins zu belegen ist.

Voraussetzung zur Beurteilung der Relevanz von Plasmafibronektin unter den genannten klinischen Bedingungen war allerdings der Vergleich und die Optimierung verschiedener, derzeit zur Verfügung stehender Testmethoden zur Konzentrationsbestimmung dieses Proteins. Wir haben deshalb zunächst drei verschiedene Meßmethoden (Immunelektrophorese nach Laurell, Immundiffusion nach Mancini, Turbidimetrie) auf ihre Praktikabilität, Reproduzierbarkeit und Präzision hin untersucht.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Untersuchungsmaterial

Für die Vorversuche wurde Citratplasma (9 Teile Blut + 1 Teil 3,8%-iges Natriumcitrat, 10 min zentrifugiert bei 4°C und 1500 g) von 10 gesunden Probanden verwendet.

In den Hauptversuchen wurden Citratplasmen von Patienten untersucht, denen ein zwei- bis vierfacher Aorto-Coronarer Bypass implantiert wurde. Die Einteilung der Patienten (Männer im Alter zwischen 40 und 60 Jahren) erfolgte in einer Doppelblindstudie in drei Gruppen zu je 20 Personen (21). Die Gruppen waren hinsichtlich Alter, Körpergewicht und -größe gut vergleichbar. Die Patientengruppe I erhielt Aprotinin (Trasylol^R, Bayer AG Leverkusen), die zweite Gruppe ein Placebo-Präparat und Gruppe III wurde mit einem neuen humanen C1-Inhibitor-Präparat (Immuno, Wien) behandelt.

Placebo und Inhibitoren wurden in gleichartigen Verpackungen angeboten, wobei die Hemmstoffe entsprechend dem in Abb. 2 dargestellten Applikationsschema in folgenden Dosierungen verabreicht wurden: 1,5 Mio KIE Aprotinin bzw. 1500 E C1-Inhibitor nach Beginn der Narkose, 500 000 KIE bzw. 500 E mit der Herz-Lungen-Maschinenfüllung und 1,0 Mio KIE Aprotinin bzw. 1000 E C1-Inhibitor nach Been-

digung der Protaminchloridgabe. Danach wurden sechsstündlich und vom zweiten Tag an achtstündlich jeweils 500 000 KIE Aprotinin, jedoch kein C1-Inhibitor mehr appliziert.

Die Patienten aller drei Gruppen erhielten initial 400 IE Heparin/kg Körpergewicht. Die erste Repetition mit 150 IE/kg Körpergewicht erfolgte bereits 5 bis 10 min nach Beginn des Bypasses und die zweite, ebenfalls mit 150 IE/kg Körpergewicht, nach 60 min, sofern die Phase der extrakorporalen Zirkulation über eine Stunde dauerte. Die Neutralisation der gesamten Heparindosis mit Protaminchlorid wurde in einem Verhältnis von 1 : 0,6-0,7 durchgeführt.

Die Studie wurde in der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie der Universität Bonn (Kirchhoff) unter der Leitung von Frau Professor Dr. Popov-Cenic (Institut für Experimentelle Hämatologie, Bonn) angefertigt. Plasmaproben wurden freundlicherweise dem Labor von Prof. Fritz (Abteilung für Klin. Chemie und Klin. Biochemie der Universität München) zur Verfügung gestellt. Hier erfolgte die Bestimmung der Blutproteine AT III, Faktor XIII, HMW- und LMW-Kininogen sowie die Hemmkonzentration des Aprotinins in Plasmen zu verschiedenen Abnahmezeiten (21,33).



Abb. 2: Schematische Darstellung der Zeiten für Blutabnahmen und Applikation der Inhibitoren Aprotinin (KIE) und C1-Inhibitor (E) bei extrakorporaler Zirkulation (aus Popov et al. 33)

1. 2. Chemikalien

Agarose L Behring OREO 14/15

Agarose-Immunelektrophorese-Tabletten Bio-Rad
Art.-Nr. 170-3003

Äthanol 96% Merck Art.-Nr. 971

Calciumlactat Merck Art.-Nr. 2103

Coomassie Brilliant Blue R-250 Serva Art.-Nr. 35051

C1-Inaktivator Immuno, Wien

Clotimmun-Fibrinogen Behring ORCH 04/05

5,5 Diäthylbarbitursäure Merck Art.-Nr. 276

Essigsäure mind. 96% reinst Merck Art.-Nr. 58

Fibronektin-Antiserum (human) Behring OSIE =5/=5

Fibronektin Calbiochem Feinbiochemica Heidelberg
Nr. 341635

Fibronektin Serva Nr. 21370

Fibronektin Sigma Product No. F 2006

Fibronektin-Kit Boehringer K.-Nr. 401218

Filterpapier LKB-Producter AB/Schweden Nr. 1850-912

Heparin-Na Organon-Teknika/Mü. Nr. 1097.01-00

LC-Partigen-Platten Fibronektin Behring Nr. 4075

Natriumacid Merck Art.-Nr. 6688

Protamin 1000 Hofmann La Roche Reg.Nr. P 1193-1

Protein-Standard-Plasma Behring OTFI 06/o7

Trasylol 200 000 KIE/10ml Bayer Reg. Nr. 48763

Tricine Sigma Art.-Nr. T 0377

Tris Fluka AG/Schweiz Art.-Nr. 8382

Triton-X-100 Serva Art.-Nr. 37240

1. 3. Geräte

Behring - Dispenser 20 μ l Nr. OVDO 10/11

Behring - Glaskapillaren Nr. OTDA 20/21

Behring - Meßprojektor

Blaubrand - Transferpettor caps 10 μ l No 701902

Brand - Transferpettor type digital 2,5-10 μ l
Cat No 701805

Eppendorf - Photometer Typ 2702

Hewlett-Packard Rechner 85

Julabo Wasserbad U3

Kienzle Drucker D 24

LKB-Multiphore-System Elektrophoresekommer

LKB - Stromgerät 2002

2. Methoden

2.1. Immunelektrophoresen

2.1.1. Rocket-Immunelektrophorese

Testprinzip:

Der Elektroimmunoassay nach Laurell (24) erlaubt es, Proteine quantitativ zu bestimmen. Die Länge ihrer Präzipitate zwischen Kathode und Anode in antikörperhaltiger Agarose dient als Maß der Proteinmenge. Anhand einer Bezugskurve, die aus Verdünnungen eines Standardpräparates mit definierter Proteinmenge erstellt wird, kann die Quantität ermittelt werden.

Testdurchführung:

Die hydrophile Seite einer 9,4 x 8,4 cm großen Plastikfolie wurde mit 12,0 ml 1%-igem Agarosegel beschichtet. Zur Herstellung des 1%-igen Gels wurde eine Agarose-Tablette (Bio-Rad) in 5,0 ml aqua dest. bzw. 1g Agarose (Behring) in 100 ml eines 0,07 M Barbital-Puffers gelöst. Die Antiserumkonzentrationen im Gel betrugen 0,6%, 0,75%, 1,0% oder 1,2%. Pro Slot (2,5 mm Durchmesser) wurden 5 µl Probe aufgetragen, die 1:2, 1:3, 1:5 bzw. 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt waren. Als Elektrodopuffer dienten entweder ein Tris-Tricine-Puffer oder ein 0,07 M Barbital-Puffer bei einer Spannung von 7 V/cm und einer Wasserkühlung von 15° C. Die Elektrophorese mittels des LKB-Multiphore-Systems erfolgte entweder 4h, 6h,

12h, 18h, 22h oder 24h lang. Danach wurden die Platten über Nacht bei Zimmertemperatur in 0,1 M Kochsalzlösung gewaschen, und vor dem Färben jeweils 15 min gewässert, gepreßt und getrocknet. Die Präzipitate wurden anschließend für 20 min in Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt und der überschüssige Farbstoff mit der nachstehend angegebenen Entfärbelösung entfernt.

- a) Barbital-Puffer : 0,07 M Barbital
2 mM Calciumlactat
pH 8,6
- b) Tris-Tricine-Puffer: 0,08 M Tris
0,024 M Tricine
0,0003 M Calciumlactat
0,02 % Natriumacid
pH 8,6
- c) Färbelösung : 10 g Coomassie Brilliant Blue R-250
900 ml Äthanol 96%
200 ml Eisessig
900 ml aqua dest.
- d) Entfärbelösung : 900 ml Äthanol 96%
200 ml Eisessig
900 ml aqua dest.

Testauswertung:

Vor der Auswertung erfolgte eine Beurteilung der Präzipitate gemäß den von Laurell (24) gestellten Kriterien. Nur völlig ausdifferenzierte Präzipitatlinien wurden hinsichtlich ihrer Länge ausgemessen.

Zur Erstellung einer Bezugskurve diente gereinigtes Fibronektin bzw. humanes Proteinstandardplasma (mit definierter Fibronektinmenge). Getestet wurden Konzentrationen von 12,5 bis 250 µg/ml. Die Auswertung der Peakhöhen erfolgte mit Hilfe eines Meßprojektors.

2.1.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Testprinzip:

Die zweidimensionale Immunelektrophorese dient zur Differenzierung des zu untersuchenden Proteins vor allen Dingen hinsichtlich eines qualitativen Nachweises eventueller Komplexbildungen. Die Auftrennung des Proteins erfolgt im antikörperfreien Gel in der ersten Laufrichtung; unterschiedliche Fraktionen mit gleichen antigenen Determinanten stellen sich in der zweiten Laufrichtung durch Präzipitationen im antikörperhaltigen Gel dar.

Testdurchführung:

15,0 ml 1%-iges antikörperfreies Agarosegel wurden auf 10 x 10 cm große Glasplatten gegossen. Die Herstellung des Gels entsprach dem der Rocket-Immunelektrophorese. Pro Glasplatte wurden bis zu sechs verschiedene Proben

unverdünnt (5 μ l) aufgetragen (Abb. 3a); die Laufzeit betrug in der ersten Dimension 2 bis 3h bei 7 V/cm. Anschließend wurden 1,5 cm breite Gelstreifen von der Glasplatte auf die hydrophile Seite von 9,4 x 8,4 cm breiten Plastikfolien übertragen, und 10,1 ml eines antikörperhaltigen Agarosegels (z.B. 0,75% Fibronektin-Antiserum) angegossen (Abb. 3b). Die Laufzeit der zweiten Dimension betrug 4h bzw. 14h bei 3 bis 4 V/cm. Die übrigen Testbedingungen wurden analog der Rocket-Immunelektrophorese gewählt.

a) 1. Dimension



b) 2. Dimension

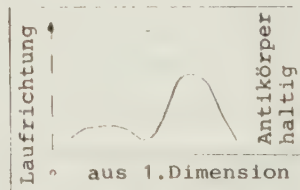


Abb. 3: Schematische Darstellung der zweidimensionalen Immunelektrophorese

2.1.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese - Intermediärgeltechnik

Testprinzip:

Zwei verschiedene Proteine mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität im antikörperfreien Agarosegel lassen sich mit Hilfe der Intermediärgeltechnik getrennt darstellen. Hierbei erfolgt die Präzipitation der Pro-

teine mittels entsprechender monospezifischer Antikörper im Zwischengel bzw. dem daran angegossenen Gel (24).

Testdurchführung:

Die Testbedingungen entsprachen weitgehend denen der zweidimensionalen Immunelektrophorese; bei der Intermediärgeltechnik wurden jedoch zwei antikörperhaltige Gele angegossen (Abb. 4). In der ersten Versuchsreihe enthielt das Zwischengel (3,3 ml) 1,0% Fibrinogen-Antiserum, das zweite Gel 1,5% Fibronektin-Antiserum. In einer zweiten Versuchsserie wurden 1,5% Fibronektin-Antiserum für das Zwischengel und 0,75% Fibrinogen-Antiserum für das zweite daran angegossene Gel (6,8 ml) verwendet. Eine Feldstärke von 7 V/cm wurde für die erste Laufrichtung, eine Feldstärke von 3 bis 4 V/cm für die zweite gewählt.

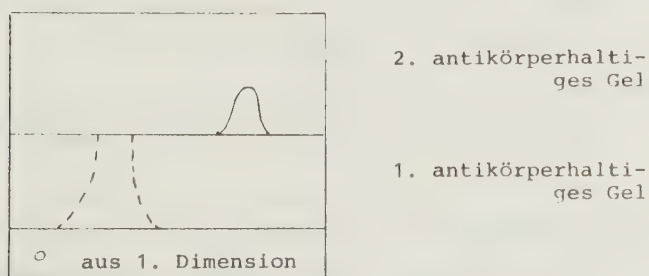


Abb. 4: Schematische Darstellung der zweidimensionalen Immunelektrophorese - Intermediärgeltechnik

2.2. Immundiffusion nach Mancini

Testprinzip:

Bei dieser Methode (25) diffundieren die Antigenmoleküle radial von einem zylinderförmigen, exakt ausgestanzten Startloch (Auftragsstelle) aus in eine mit monospezifischem homologen Antiserum vermischte Agarschicht, wobei sich ein mit der Zeit wachsendes konzentrisches Präzipitat bildet, dessen innerer Rand vom Antigenreservoir (Startloch) gebildet wird, und dessen äußere Begrenzung die gut sichtbare Präzipitationskante darstellt. Der Durchmesser der Präzipitationsfläche bzw. des Präzipitatrings hängt außer von der Antigenkonzentration wesentlich von der Molekülgröße des Antigens ab. Unter geeigneten standardisierten Versuchsbedingungen ist der quadrierte Durchmesser des Präzipitatkreises bzw. die gebildete Präzipitationsfläche der Antigenmenge proportional. Anhand einer Bezugsgeraden, die durch Verwendung bekannter Standardwerte hergestellt wird, können die unbekannten Antigenkonzentrationen ermittelt werden.

2.2.1. Selbstgefertigte Gele

Die hydrophile Seite einer 8,4 x 9,4 cm großen Plastikfolie wurde mit 12 ml 1%-igem Agarosegel beschichtet. Die Agarose war in einem Ouchterlony-Puffer gelöst. In die Gelschicht wurden 16 Löcher gestanzt und 5 μ l des zu untersuchenden Plasmas aufgetragen. Die Folien wur-

den 3 Tage bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer aufbewahrt und analog der Rocket-Immunelektrophorese gefärbt (Auswertung siehe LC-Partigen-Platten!).

Ouchterlony-Puffer: 8,92 g Barbital-Natrium

5,89 g Natrium-Acetat x 3 H₂O pro Liter

200 mg Thimerosal

0,1 N HCl (150 ml)

Für den Gebrauch: Puffer 1+1 mit aqua dest. verdünnen.

2.2.2. LC-Partigen-Platten

Die kommerziell erhältlichen Immundiffusionsplatten enthielten in der Agarosegelschicht bereits eine standardisierte Menge an spezifischem Antiserum gegen Fibronektin. Die Auftragsstellen wurden mit je 20 µl Probe (unverdünnt) bzw. Verdünnungen eines Standardpräparates beschickt. Die verschlossenen Platten blieben 3 Tage bei Raumtemperatur stehen. Die Durchmesser der Präzipitatringe wurden mit einem Meßprojektor ausgemessen, quadriert und die Proteinmenge mit Hilfe einer Standardkurve berechnet, die aus jeweils 1:1 (unverdünnt), 1:2 und 1:4 verdünntem humanen Proteinstandardplasma mit bekannter Fibronektinkonzentration erstellt wurde.

2.3. Turbidimetrischer Immunoassay

Testprinzip:

Der turbidimetrische Immunoassay beruht auf einer kinetischen Trübungsmessung der Antigen-Antikörper-Reaktion nach dem Prinzip der "Endzeit"-Methode (60).

Testdurchführung:

Die Bestimmungen erfolgten bei einer Wellenlänge von Hg 365 nm, in Halbmikroküvetten von 1 cm Schichtdicke und einer Inkubationstemperatur von 25°C.

Pipettiert wurde nach folgendem Schema:

	Standard	Kontrolle	Probe
Standard-Lösungen 0 bis 1000 µg/ml	0,01 ml	-	-
Kontroll-Lösung	-	0,01 ml	-
Probe	-	-	0,01 ml
Reaktionsgemisch (1 Teil Antiserum verdünnt mit 10 Teilen Antiserumpuffer)	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml

Genau 60 sec nach der Zugabe des Reaktionsgemisches erfolgte die Messung der Extinktion E_1 und nach weiteren 10 min die Messung der Extinktion E_2 . Bei jeder Meßserie wurden die Standards mitgeführt, und zur Überprüfung der Pipettiergenauigkeit teilweise Doppelbestimmungen von Proben und Standards angesetzt.

Testauswertung:

Aus den beiden Extinktionen E_1 und E_2 wurde die Extinktionsdifferenz ΔE berechnet. Auf linearem Millimeterpapier wurden die Standardkonzentrationen gegen die Extinktionsdifferenzen aufgetragen (Abszisse: $\mu\text{g/ml}$; Ordinate: ΔE) und aus dem linearen Teil der Eichkurve die Probenwerte ermittelt.

2.4. Untersuchungen zur Präzision

Beim Vergleich verschiedener Bestimmungsmethoden für dieselbe Substanz muß zunächst die Präzision, d.h. die Meßgenauigkeit jeder einzelnen Methode ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Präzisionsuntersuchungen der drei Bestimmungsmethoden (quantitativer Elektroimmunoassay nach Laurell, quantitative Proteinbestimmung mit Immundiffusionsplatten und turbidimetrischer Immunoassay) für Fibronektin im Plasma in Anlehnung an die Empfehlungen der Kleinkonferenz der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (10).

Präzision in der Serie

An zwei Tagen wurde mittels jeder Bestimmungsmethode zehnfach das Fibronektin in den Plasmaproben A und B gemessen, wobei es sich bei A um das Plasma eines gesunden männlichen Probanden handelte, während B ein Poolplasma (10 gesunde Spender) darstellte. Diese "Normalplasmen" wurden bei allen drei Meßverfahren eingesetzt. Am ersten Tag wurde für jede Methode Normalplasma A verwendet, am zweiten Tag entsprechend das Normalplasma B.

Für die einzelnen Methoden wurden anhand der 10 Meßwerte jedes Untersuchungstages der Mittelwert $\bar{x}$, die Standardabweichung S , die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) und der Variationskoeffizient VK berechnet.

Präzision von Tag zu Tag

An 10 aufeinanderfolgenden Tagen wurde mittels der einzelnen Bestimmungsmethoden täglich in Zweifachbestimmung Fibronectin im Plasma desselben männlichen Spenders gemessen. Das Normalplasma wurde am ersten Tag der Untersuchung gewonnen und frisch verwendet. Für die neun folgenden Untersuchungen wurden Portionen dieses Plasmas tiefgefroren und zur Analyse jeweils im Wasserbad bei 37° C aufgetaut.

Anhand der Einzelmeßwerte wurden die Parameter Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung S , Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) und Variationskoeffizient VK berechnet.

C. ERGEBNISSE

1. Vorversuche

1.1. Rocket-Immunelektrophorese

1.1.1. Elektrophoresebedingungen

Elektrophoresepuffer: In den meisten bisher veröffentlichten Untersuchungen zum immunelektrophoretischen Verhalten des Fibronektins wurde Barbitalpuffer verwendet. In unseren Versuchen sprach jedoch gegen die Anwendung dieses Puffers eine bereits nach 6 Stunden zu beobachtende signifikante pH-Änderung, die nach 18 Stunden an der Kathode einen pH-Wert von 7,2 und an der Anode einen pH-Wert von 10,0 ergab. Weiterhin fand sich an der Anode eine starke Salzabscheidung, die keine konstante Feldstärke über die notwendige Laufzeit gewährleistete. Zudem blieb eine nicht unerhebliche Menge Protein an der Auftragsstelle haften. Im Unterschied zum Tris-Tricine-Puffer, der sehr konstante Elektrophoresebedingungen ermöglichte, waren außerdem kürzere Laufstrecken und z.T. nicht vollständig ausdifferenzierte Peaks (mit Doppelkontur) feststellbar (Abb. 5a,b).

Antikörperkonzentration des Gels: Bei Verwendung des Barbitalpuffers waren Konzentrationen von 0,6 bis 0,75% Antiserum ausreichend, während für den Tris-Tricine-Puffer Konzentrationen von 1,2% benötigt wurden, um auch höhere Fibronektinmengen in einem gut abzulesenden Bereich darstellen zu können (Abb. 6a,b).

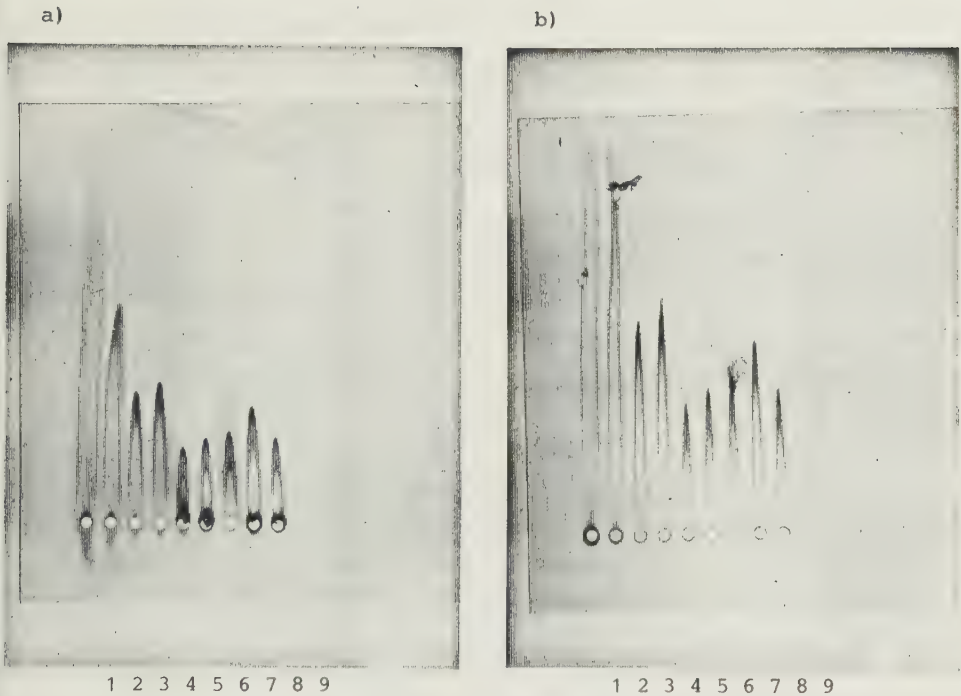


Abb.5: Rocket-Immunelektrophorese von Plasmafibronektin
1% Agarose mit 0,75% Antiserum gegen Fibronektin;
7 V/cm; 18 Stunden Laufzeit

a) Barbitalpuffer

b) Tris-Tricine-Puffer

Auftragsstelle 1-3: Proteinstandardplasma

(260 $\mu\text{g/ml}$, 130 $\mu\text{g/ml}$, 65 $\mu\text{g/ml}$)

4-9: Normalplasma 1:5 verd.

Elektrophoreselaufzeit: Getestet wurden Zeiten zwischen 4 h und 24 h. Im Bereich von 4 bis 12 h konnte keine Ausdifferenzierung des Plasmaproteins erreicht werden, während Laufzeiten von 16 bis 24 h ähnlich gut ausdifferenzierte Proteinpeaks ergaben (Abb.6a,b).

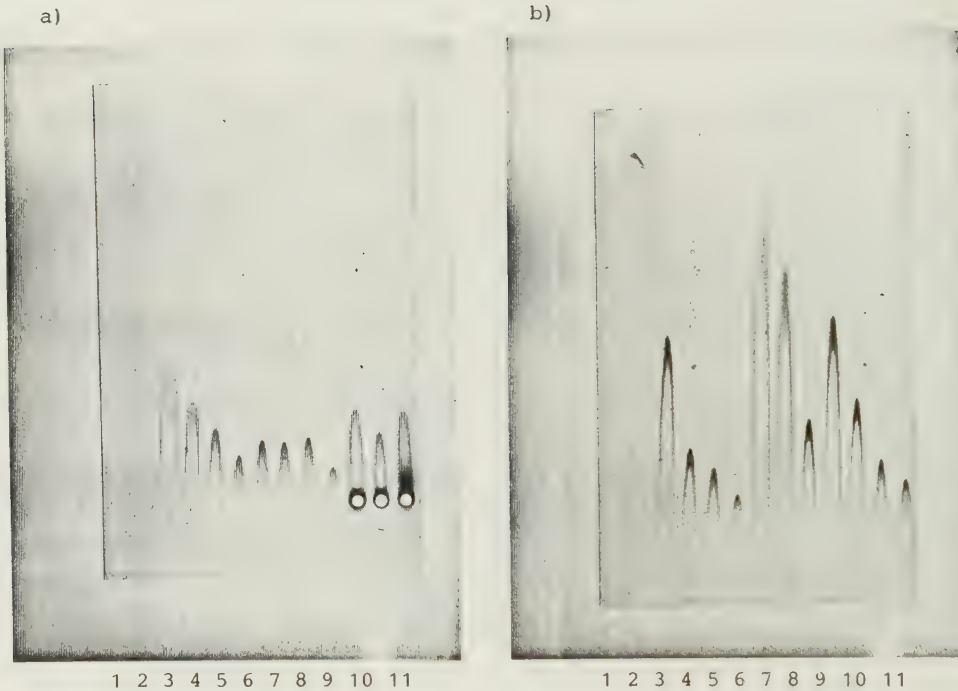


Abb.6: Rocket-Immunelektrophorese von Plasmafibronektin
in 1% Agarose mit 0,75% Antiserum gegen Fibronektin

a) Barbitalspuffer b) Barbitalspuffer
7 V/cm; 4 h Laufzeit 7 V/cm; 18 h Laufzeit

Auftragsstelle 1-4: Gereinigtes Sigma-Fibronektin
(300, 200, 150, 100 µg/ml)

8 : Normalplasma (unverdünnt)
9 : Normalplasma (1:2 verdünnt)
10 : Normalplasma (1:5 verdünnt)
11 : Normalplasma (1:10 verdünnt)

1.1.2. Eichkurve:

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden drei verschiedene kommerziell erhältliche Fibronektine (von Sigma, Serva und Calbiochem), die Standards des turbidimetrischen Assays der Firma Boehringer (siehe Abschnitt Methoden 2.3.) sowie ein Proteinstandardplasma der Behring-Werke mit definierter Fibronektinmenge verwendet.

Die Fibronektine der Firmen Sigma, Serva, Calbiochem und Behring ergaben vergleichbare Ergebnisse. Sie erwiesen sich jedoch für die quantitative Auswertung insofern ungeeignet, als sich die Eichkurve bei Konzentrationen über 100 µg/ml bereits einer Exponentialfunktion annäherte (Abb.7).

Bei Benutzung eines Proteinstandardplasmas mit definierter Fibronektinkonzentration konnte im Bereich von 12,5 bis 150 µg/ml eine lineare Bezugskurve erstellt werden, die den benötigten Konzentrationsbereich zur Bestimmung der Plasmaproben (bei geeigneter Vorverdünnung!) in den meisten Fällen abdeckte (Abb.8). Bei einem Vergleich von frisch gelöstem Proteinstandardplasma mit einer mehrere Tage alten Lösung blieben die Kurven unverändert.

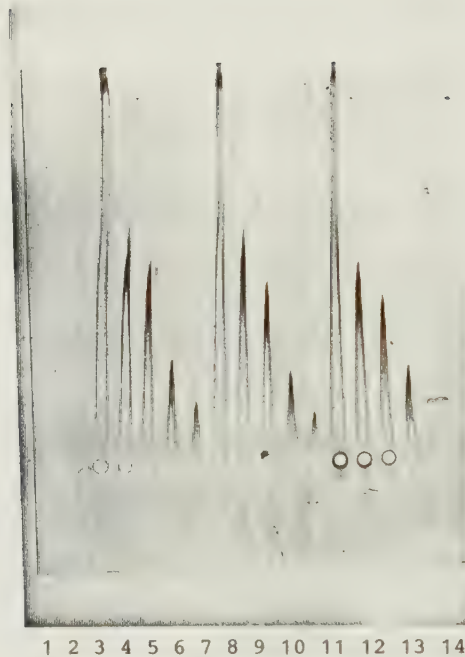


Abb.7: Rocket-Immunelektrophorese zur Erstellung einer
Fibronektin-Eichkurve

1% Agarose mit 1,2% Antiserum gegen Fibronektin;

Puffer: Tris-Tricine, 5 μ l Probe, 7 V/cm, 18 h Laufzeit

Auftragsstelle 1-5: gereinigtes Calbiochem-Fibronektin

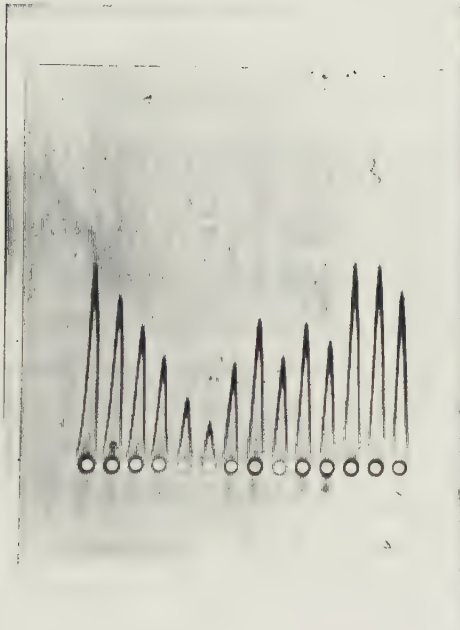
(250, 200, 150, 100, 50 μ g/ml)

6-10: gereinigtes Serva-Fibronektin

(250, 200, 150, 100, 50 μ g/ml)

11-14: gereinigtes Sigma-Fibronektin

(250, 200, 150, 100 μ g/ml)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Abb.8: Rocket-Immunelektrophorese zur Erstellung einer
Fibronektin-Eichkurve

1% Agarose mit 1,2% Antiserum gegen Fibronektin;

Puffer: Tris-Tricine, 5 μ l Probe, 7 V/cm, 18 h Laufzeit

Auftragsstelle 1-6: Proteinstandardplasma

(125, 100, 75, 50, 25, 12,5 μ g/ml)

7-14: Patientenplasma (1:3 verdünnt)

1.1.3. Probenvorbereitung

Durch mehrmaliges Einfrieren der Proben ergaben sich unterschiedliche Fibronektinkonzentrationen. Nach dreimaligen Auftauen bei Raumtemperatur lagen die Werte um 7%, bei fünfmaligen Auftauen um 15% höher. Auftauen bei 37°C veränderte die Fibronektinkonzentration hingegen nicht. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Karges und Mitarbeitern (20) überein.

Für die Wahl der geeigneten Plasmaverdünnungen wurden Verdünnungen von 1:2, 1:3, 1:5 und 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung untersucht. Mit steigenden Verdünnungen ergaben sich jedoch höhere Fibronektinwerte. Die 1:3 Verdünnung entsprach den in der Literatur angegebenen Fibronektinkonzentrationen für Normalplasma (6), während eine 1:10 Verdünnung einen dreifach erhöhten Wert nach sich zog.

Auch der Zusatz von 0,1% Triton X 100 konnte dies nicht verhindern. Da die Ursache für dieses Verhalten nicht geklärt werden konnte, haben wir uns für eine 1:3 Verdünnung entschieden, wodurch sowohl erniedrigte als auch erhöhte Werte über einen weiten Bereich erfaßt werden konnten.

1.1.4. Einfluß von Fibrinogen, Aprotinin, C1-Inhibitor,
Heparin und Protaminchlorid auf den Fibronektin-
nachweis

Die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Heparin (5 IE/ml, 100 IE/ml, 400 IE/ml) zu einem gereinigten Fibronektin (290 µg/ml) zeigte in der Rocket-Immunelektrophorese im Vergleich zur Ausgangskonzentration einen um bis zu 10% erniedrigten Fibronektinpeak. Eine Abnahme der ermittelten Fibronektinkonzentration um 40% konnte jedoch bei Zusetzen einer der Konzentration im Normalplasma entsprechenden Fibrinogenmenge (300 µg/ml) festgestellt werden.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine Änderung des Plasmafibronektins auf in vivo Vorgänge während der Operation oder aber auf die Verabreichung der in B.1.1.1. "Untersuchungsmaterial" beschriebenen Medikation zurückzuführen ist, versetzten wir Normalplasma-proben wahlweise mit Aprotinin (50 KIE/ml, 100 KIE/ml), C1-Inhibitor (0,5 E/ml, 1 E/ml), Heparin (5 IE/ml) und Protaminchlorid (3,5 E/ml). Diese Werte entsprachen den in den Patientenplasmen bei extrakorporaler Zirkulation enthaltenen Konzentrationen; die Bedingungen für die Rocket-Immunelektrophorese (1,2% Antiserum gegen Fibronektin, 18 h Laufzeit bei 7 V/cm wählten wir entsprechend den Hauptversuchen.

Es zeigten sich sowohl in der mit Aprotinin als auch in

der mit dem C1-Inhibitor behandelten Plasmaprobe nur minimale Unterschiede zur Ausgangskonzentration. Geringfügig niedrigere Fibronektinwerte (5-7%) stellten wir bei allen mit Heparin versetzten Proben fest, während bei Neutralisation des Heparins mit Protaminchlorid die Konzentrationen wieder den Ausgangswert erreichten. Die mittels der Immundiffusion und des turbidimetrischen Testes erhaltenen Werte lagen im Durchschnitt um 15% niedriger, zeigten ansonsten jedoch der Rocket-Immunelektrophorese vergleichbare Verläufe.

1.1.5. Untersuchungen zur Präzision

Präzision in der Serie

Da die Präzisionsmessungen der Immundiffusion wie auch die des turbidimetrischen Testes aus Kostengründen auf eine 10-fache Analyse desselben Testplasmas beschränkt werden mußten, wurde auch beim Elektroimmunoassay aus Vergleichsgründen auf die eigentlich für eine Kontrolle der Präzision in der Serie erforderliche 20-fache Analyse verzichtet. Das jeweilige Testplasma wurde in einer Verdünnung von 1:3 (mit 0,9%-iger NaCl) verwendet.

In Tabelle 1 sind die Meßwerte je Untersuchungstag mit den entsprechenden Präzisionsparametern dargestellt. Die Präzision in der Serie zeigt eine Standardabweichung vom Mittelwert von 6,3 bzw 6,7 und Variationskoeffizienten von 5,7% bzw. 7,2%.

Tabelle 1:

Meßergebnisse für die Präzision in der Serie des quantitativen Elektroimmunoassay nach Laurell an 2 Tagen (I,II) in zwei verschiedenen Normalplasmen (A,B) sowie berechnete Präzisionsparameter.

Untersuchungstag	I	II
Normalplasma	A	B
Einzelmeßwerte	299 262 321 295 274 262 267 274 293 261	370 379 392 370 408 335 356 354 390 368
Mittelwert $\bar{x}$	280,8	372,2
Standardabweichung S	20,2	21,2
Standardabweichung von $\bar{x}$ (=SEM)	6,3	6,7
Variationskoeffizient %	7,2	5,7

Präzision von Tag zu Tag

Wie bei der Untersuchung der Präzision in der Serie wurde auch bei der Testung von Tag zu Tag das zu untersuchende Normalplasma in einer 1:3 Verdünnung mit 0,9% NaCl verwendet.

Die Einzelmeßwerte sowie die berechneten Parameter für die Meßgenauigkeit des quantitativen Elektroimmunoassays nach Laurell bei sukzessiver Analyse einer Plasmaprobe an 10 aufeinanderfolgenden Tagen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die Parameter für die Präzision des quantitativen Elektroimmunoassays von Tag zu Tag eine Streuung der Einzelmeßwerte um die jeweiligen Mittelwerte mit Variationskoeffizienten von 2,4% und 2,6% aufweisen.

Tabelle 2:

Meßergebnisse für die Präzision von Tag zu Tag des quantitativen Elektroimmunoassays sowie berechnete Parameter.

	Einzelmeßwerte (Doppelproben)	
Untersuchungstag 1	293	289
2	286	289
3	284	291
4	285	292
5	290	291
6	282	287
7	270	272
8	291	280
9	281	282
10	291	289
Mittelwert $\bar{x}$	285,3	287,2
Standardabweichung S	6,7	7,5
Standardabweichung von $\bar{x}$ (=SEM)	2,1	2,3
Variationskoeffizient %	2,4	2,6

1.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese

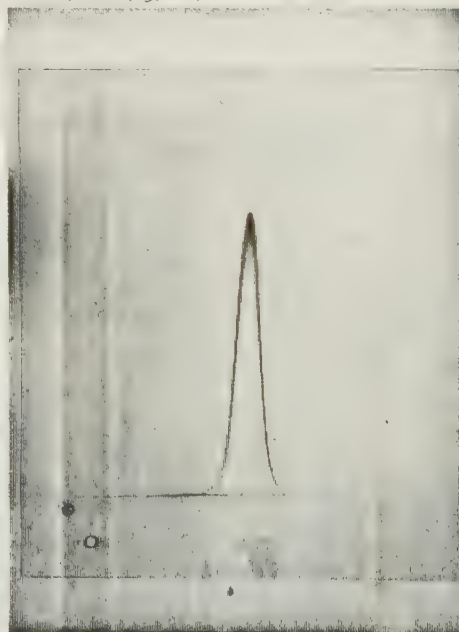
1.2.1. Vergleich: Normalplasma - Proteinstandardplasma - gereinigtes Fibronektin

Um einen geeigneten Standard für die Rocket-Immunelektrophorese zu finden, wurden auch zweidimensionale Immunelektrophoresen verschiedener Plasmafibronektine angefertigt. Dabei ergaben sich bei gleich gewählten Konzentrationen identische Elektrophoresen des Normalplasmas und des Proteinstandardplasmas, während das gereinigte Fibronektin einen erhöhten Peak bei gleich langer Laufstrecke (in der 1.Dimension) zeigte (Abb.9 a,b,c).

a) Normalplasma (290 µg/ml)



b) Proteinstandardplasma
(290 µg/ml)



c) gereinigtes Fibronectin (290 µg/ml)

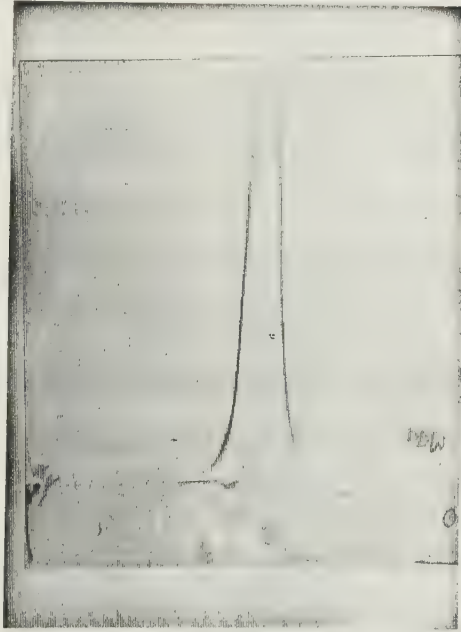


Abb.9: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Plasma-
fibronectin

1% Agarose mit 0,75% Antiserum gegen Fibronectin

Puffer: Tris-Tricine, 5 µl Probe

1.Dimension: 7 V/cm, 3 h Laufzeit

2.Dimension: 3 V/cm, 14 h Laufzeit

1.2.2. Einfluß von Heparin

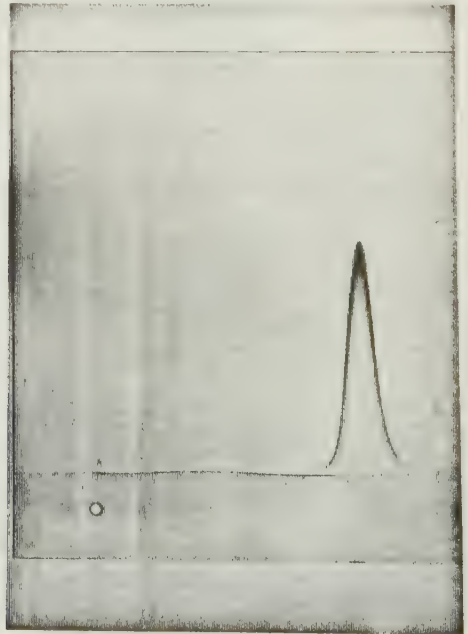
Einem Proteinstandardplasma, einem Normalplasma und einem gereinigten Fibronektin wurden wahlweise 5 IE/ml, 100 IE/ml und 400 IE/ml Heparin zugegeben.

Dabei zeigte sich in der zweidimensionalen Immunelektrophorese des Proteinstandardplasmas (und des Normalplasmas) ein zusätzlicher Peak an der Auftragsstelle, eine kürzere Laufstrecke des Hauptpeaks in der 1.Dimension, sowie mit steigender Heparinkonzentration ein verminderter Fibronektingipfel (Abb.10 a,b) im Vergleich zu Abb.10 c,d. Bei dem gereinigten Fibronektin fehlte der zusätzliche Peak an der Auftragsstelle, es zeigte sich jedoch auch, ebenfalls abhängig von der gewählten Heparinmenge, ein niedrigerer Fibronektinpeak (Abb.10 c,d).

a) Proteinstandardplasma

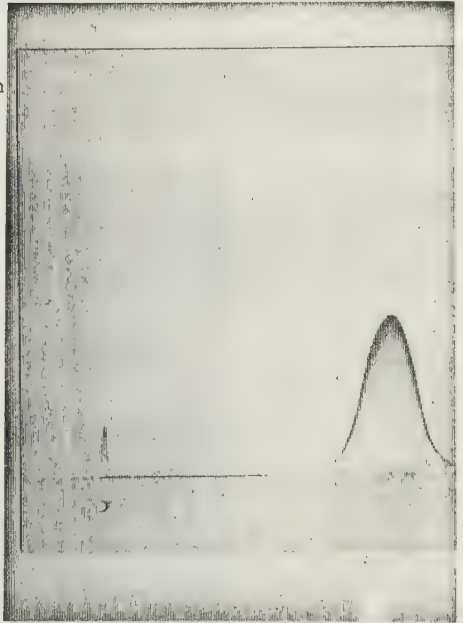
290 µg/ml +

5 IE/ml Heparin



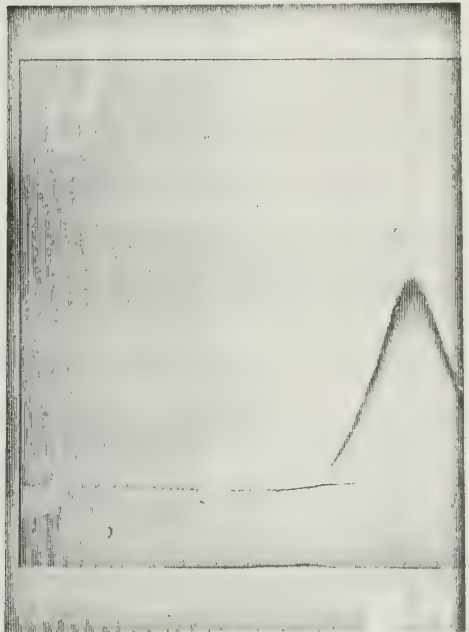
b) Proteinstandardplasma

290 $\mu\text{g/ml}$ + 100 IE/ml Heparin



c) gereinigtes Fibronektin

290 $\mu\text{g/ml}$ + 5 IE/ml Heparin



d) gereinigtes Fibronectin

290 µg/ml + 400 IE/ml Heparin

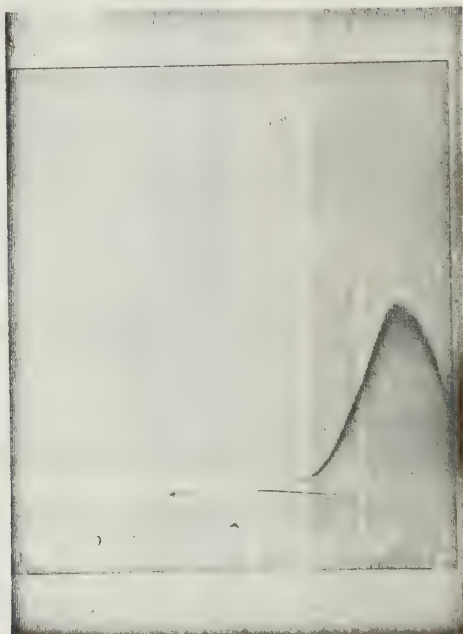


Abb.10: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Plasma-
fibronectin

1% Agarose mit 0,75% Antiserum gegen Fibronectin

Puffer: Tris-Tricine, 5 µl Probe

1.Dimension: 7 V/cm, 3,5 h Laufzeit

2.Dimension: 3 V/cm, 14 h Laufzeit

1.2.3. Einfluß von Fibrinogen

Zum Nachweis eines eventuell veränderten Fibronektinpeaks wurde ein gereinigtes Fibronektin mit der dem Normalplasma entsprechenden Konzentration an Fibrinogen (300 µg/ml) versetzt. Hierbei zeigte sich in der zweidimensionalen Immunelektrophorese ein im Gegensatz zu den in 1.2.1. und 1.2.2. dargestellten Elektrophoresen deutlich verminderter Fibronektinpeak (Abb.11 a).

Bei Zugabe unterschiedlicher Heparinkonzentrationen (5 IE/ml, 100 IE/ml, 400 IE/ml) zu der oben beschriebenen Probe konnten wir stark verringerte Fibronektinipfel feststellen; Abb.11 b zeigt nahe der Auftragsstelle 2 zusätzliche Peaks.

a) gereinigtes Fibronektin

(290 µg/ml) + Fibrinogen

(300 µg/ml)



b) gereinigtes Fibronektin

(290 $\mu\text{g/ml}$) + Fibrinogen (300 $\mu\text{g/ml}$) + 400 IE/ml Heparin



Abb.11: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Plasma-fibronektin

1% Agarose mit 0,75% Antiserum gegen Fibronektin

Puffer: Tris-Tricine, 5 μl Probe

1.Dimension: 7 V/cm, 3 h Laufzeit

2.Dimension: 3 V/cm, 14 h Laufzeit

1.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese - Intermediär-geltechnik

Für die Wahl eines geeigneten Standards zur Bestimmung von Fibronektin im Plasma haben wir die zur Verfügung stehenden Präparate (gereinigtes Fibronektin, Calbiochem und Proteinstandardplasma, Behringwerke) im Vergleich zu Normalplasmaproben auch mittels der Intermediärgeltechnik untersucht.

Da Fibronektin sehr häufig an Fibrinogen gebunden vorliegt, sollte uns diese Methode insbesondere Aufschluß darüber geben, ob durch den spezifischen Antikörper gegen Fibronektin auch Fibrinogen mit erfaßt wird, und somit gegebenenfalls verfälschte Fibronektinkonzentrationen in der Rockettechnik gemessen werden.

1.3.1. Fibrinogen-Antiserum im Zwischengel

Zum Zwischengel wurde ein Fibrinogen-Antiserum in einer Konzentration von 0,75% gegeben, sowie 0,75% Fibronektin-Antiserum in das daran anschließende Gel.

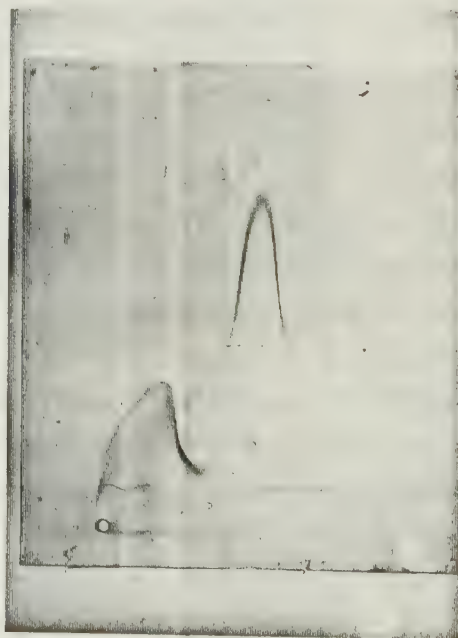
Proteinstandardplasma und Normalplasma zeigten ein nahezu identisches Erscheinungsbild (Abb.12 a,b). In beiden Elektrophoresen ließ sich ein relativ hoher Fibrinogen-peak (im Zwischengel), sowie ein gleichartiger Fibronektingipfel (im 2. antikörperhaltigen Gel) nachweisen. Die Laufstrecken der beiden Proteine in der ersten Dimension entsprachen sich für Proteinstandarplasma und Normalplasma ebenfalls weitgehend.

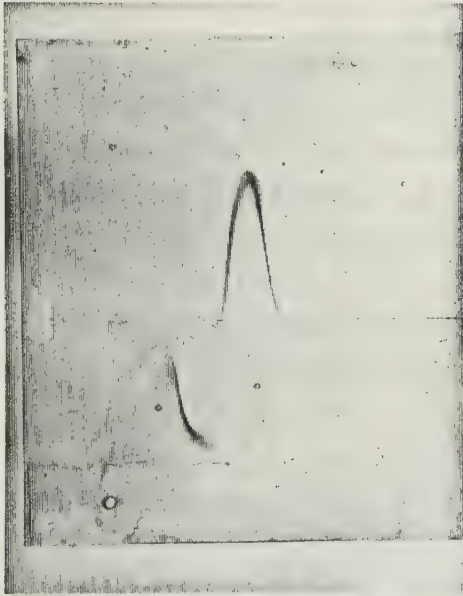
Beim gereinigten Fibronektin hingegen konnte kein Fibrinogen nachgewiesen werden; das Fibronektin legte in der ersten Dimension eine geringfügig längere Wegstrecke zurück, und das Immunpräzipitat war trotz einer den Plasmapräparaten gleich gewählten Fibronektinkonzentration von 290 $\mu\text{g/ml}$ in der zweiten Dimension etwas niedriger ausgeprägt (Abb.12 c)

a) Proteinstandardplasma

angegossenes Gel:
0,75% Fibronektin-
Antiserum

Zwischengel:
0,75% Fibrinogen-
Antiserum





b) Normalplasma (unverdünnt)

angegossenes Gel:

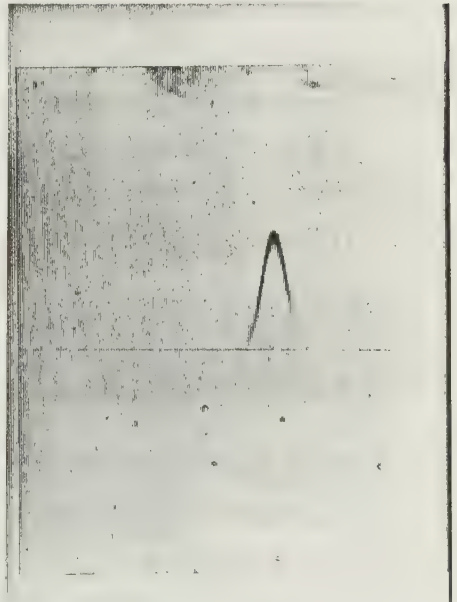
0,75% Fibronektin-

Antiserum

Zwischengel:

0,75% Fibrinogen-

Antiserum



c) gereinigtes Fibronektin

(290 μ g/ml)

angegossenes Gel

0,75% Fibronektin-

Antiserum

Zwischengel:

0,75% Fibrinogen-

Antiserum

Abb.12: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Plasma-

fibronektin - Intermediärgeltechnik

1% Agarose, Puffer: Tris-Tricine, 5 μ l Probe

1.Dimension: 7 V/cm, 3 h Laufzeit

2.Dimension: 3 V/cm, 14 h Laufzeit

1.3.2. Fibronektin-Antiserum im Zwischengel

In dieser Versuchsreihe wurden zum Zwischengel ein Fibronektin-Antiserum in einer Konzentration von 1,5%, sowie 0,75% Fibrinogen-Antiserum in das angegossene Gel gegeben; durch die Erhöhung der Antiserumkonzentration im Zwischengel sollte eine bessere Präzipitierung erzielt werden. Bei Verwendung von Normalplasma trat im Bereich der Fibrinogen-Fraktion ein zusätzlicher Fibronektin-Peak im

Zwischengel auf (Abb.13↑), der offensichtlich für das Vorhandensein eines Fibronektin-Fibrinogen-Komplexes im Plasma spricht. Ein entsprechendes Präzipitat konnte hingegen mit dem gereinigten Fibronektin nicht nachgewiesen werden.

angegossenes Gel:

0,75% Fibrinogen-

Antiserum

Zwischengel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum

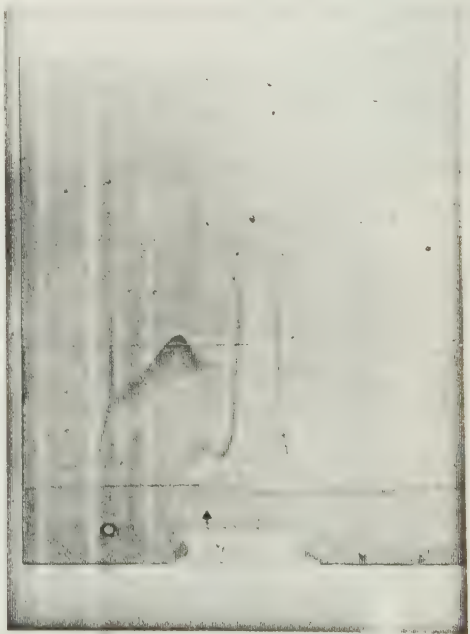


Abb.13: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Plasma-fibronektin - Intermediärgeltechnik

1% Agarose, Puffer: Tris-Tricine, 5 µl Probe

1.Dimension: 7 V/cm, 3 h Laufzeit

2.Dimension: 3 V/cm, 14 h Laufzeit

1.3.3. Einfluß von Heparin

Zum Nachweis von möglicherweise entstehenden Fibronektin-Heparin-Komplexen wurden sowohl dem Proteinstandardplasma als auch dem gereinigten Fibronektin (beide in einer Konzentration von 290 µg/ml) wahlweise 5 IE/ml und 100 IE/ml Heparin zugegeben.

Fibrinogen-Antiserum im Zwischengel

Bei Verwendung des Proteinstandardplasmas zeigte sich im Bereich der Auftragsstelle ein zusätzlicher Peak im anti-Fibronektin-haltigen Gel (Abb.14 a,b); mit steigender Heparinkonzentration konnten wir für diesen Peak eine größere, für den Fibronektinpeak jedoch gleichzeitig eine verminderte Höhe feststellen. Eine entsprechende Präzipitation wurde für das gereinigte Fibronektin nicht detektiert; es zeigte sich mit steigender Heparinkonzentration ein verminderter Peak (Abb.14 c,d).

a) Proteinstandardplasma

290 µg/ml +

5 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

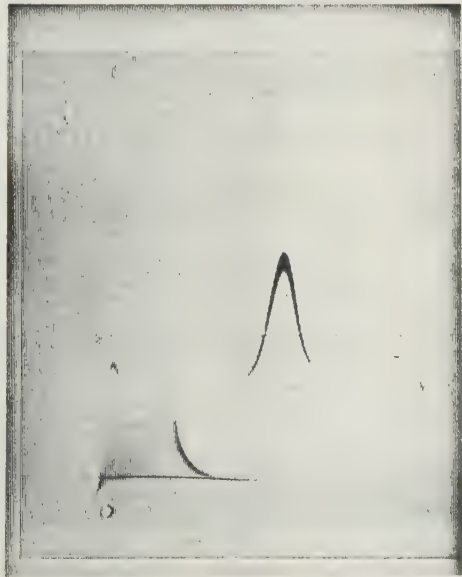
1,5% Fibronektin-

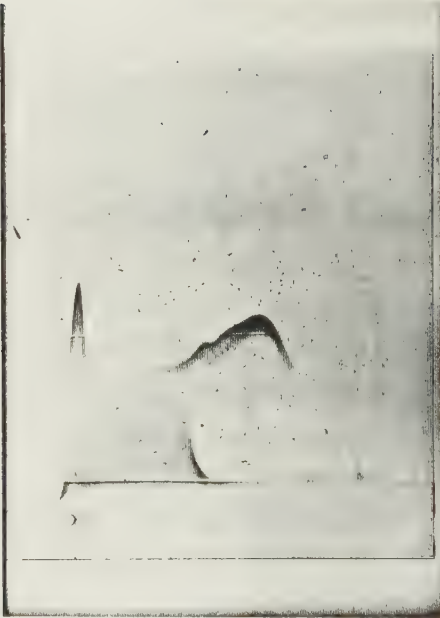
Antiserum

Zwischengel:

1% Fibrinogen-

Antiserum





b) Proteinstandardplasma

290 $\mu\text{g/ml}$ +

100 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum

Zwischengel:

1% Fibrinogen-

Antiserum

c) gereinigtes Fibronektin

290 $\mu\text{g/ml}$ +

5 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

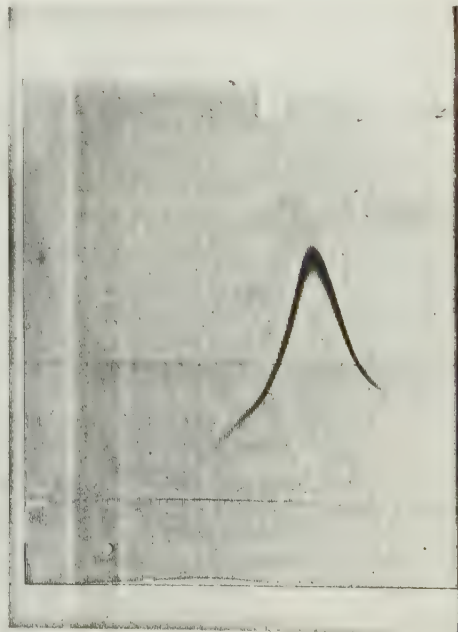
1,5% Fibronektin-

Antiserum

Zwischengel:

1% Fibrinogen-

Antiserum



d) gereinigtes Fibronektin

290 µg/ml +

100 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum

Zwischengel:

1% Fibrinogen-

Antiserum

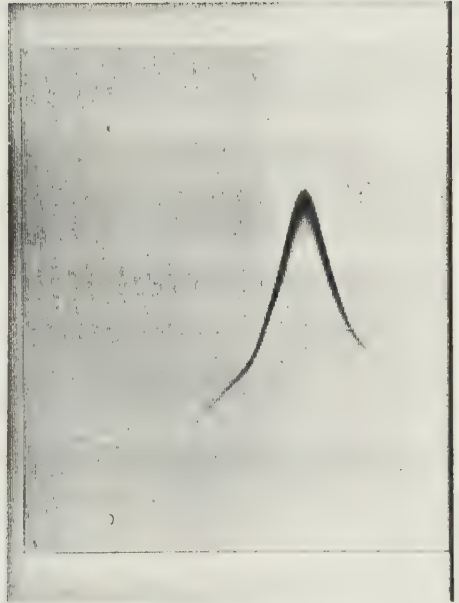


Abb.14: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Plasma-
fibronektin - Intermediärgeltechnik
1% Agarose, Puffer: Tris-Tricine, 5 µl Probe
1.Dimension: 7 V/cm, 3 h Laufzeit
2.Dimension: 3 V/cm, 14 h Laufzeit

Fibronektin-Antiserum im Zwischengel

Dem Zwischengel wurde ein Fibronektin-Antiserum in einer Konzentration von 1,5% sowie 0,75% Fibrinogen-Antiserum dem angegossenen Gel zugefügt.

Auch hier zeigte sich bei dem Proteinstandardplasma ein zusätzlicher Peak an der Auftragsstelle, dessen Höhe, ebenso wie der Fibronektin-Peak, abhängig war von der gewählten Heparinkonzentration (Abb.15 a,b), während er bei dem gereinigten Fibronektin fehlte; jedoch stellten wir mit steigender Heparinkonzentration einen geringfügig verminderten Fibronektinpingfel fest (Abb.15 c,d).

a) Proteinstandardplasma

290 µg/ml +

5 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

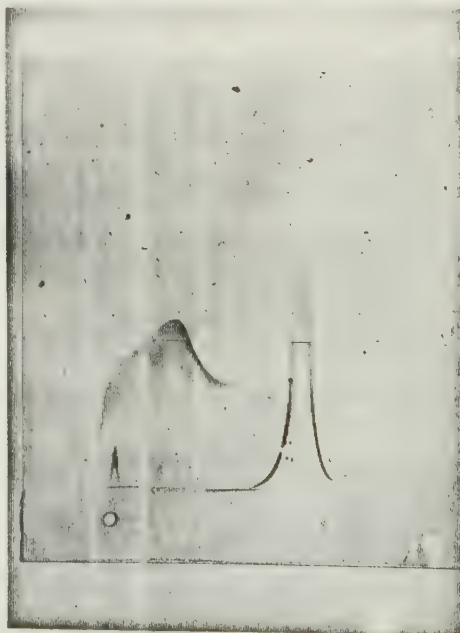
0,75% Fibrinogen-

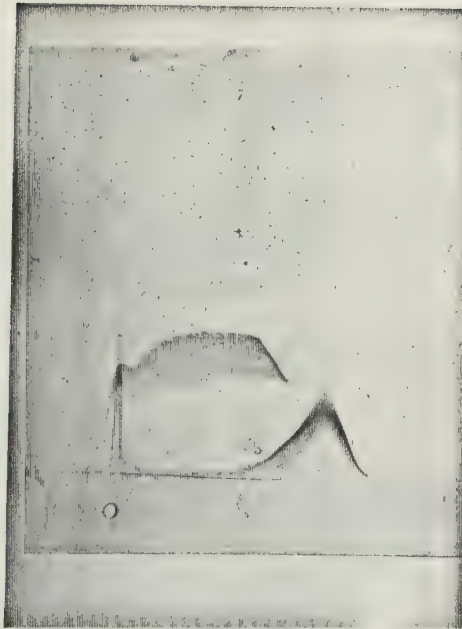
Antiserum

Zwischengel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum





b) Proteinstandardplasma

290 $\mu\text{g/ml}$ +

100 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

0,75% Fibrinogen-

Antiserum

Zwischengel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum

c) gereinigtes Fibronektin

290 $\mu\text{g/ml}$ +

5 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

0,75% Fibrinogen-

Antiserum

Zwischengel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum



d) gereinigtes Fibronectin

290 $\mu\text{g/ml}$ +

100 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

0,75% Fibrinogen-

Antiserum

Zwischengel:

1,5% Fibronectin-

Antiserum

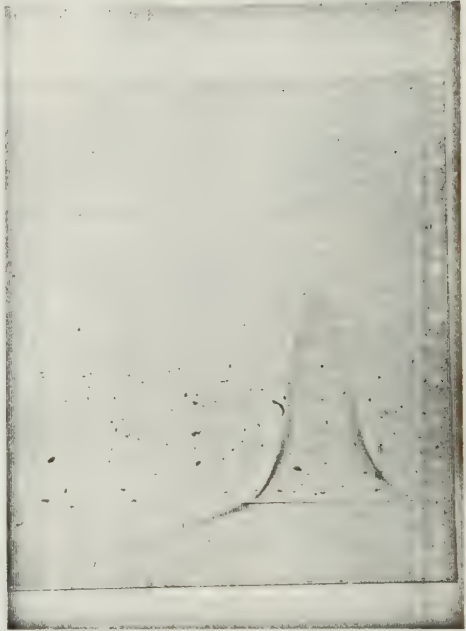


Abb.15: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Plasma-
fibronectin - Intermediärgeltechnik

1% Agarose, Puffer: Tris-Tricine, 5 μl Probe

1.Dimension: 7 V/cm, 3 h Laufzeit

2.Dimension: 3 V/cm, 14 h Laufzeit

1.3.4. Einfluß von Fibrinogen

Gemäß C.1.2.3. untersuchten wir auch mittels der zweidimensionalen Immunelektrophorese-Intermediärgeltechnik die Änderung des Fibronektinpräzipitates bei Zugabe von Fibrinogen (300 $\mu\text{g/ml}$) zu einem gereinigten Fibronektin (290 $\mu\text{g/ml}$). Sowohl bei 1%-igem Antiserum gegen Fibronektin im Zwischengel (Abb.16 a), als auch bei einem Zwischengel mit 1%-igem Antiserum gegen Fibrinogen (Abb. 16 b) zeigte sich ein deutlich verminderter Fibronektinringpfel. Durch 100 IE/ml Heparin, die in einer weiteren Elektrophorese der obigen Probe zugefügt wurden (Zwischengel: 1,5% Antiserum gegen Fibronektin) stellten wir eine zusätzliche Abnahme des Peaks fest, jedoch keinen Peak an der Auftragsstelle (Abb.16 c).

a) gereinigtes Fibronektin

(290 $\mu\text{g/ml}$) +

Fibrinogen (300 $\mu\text{g/ml}$)

angegossenes Gel:

0,75% Fibrinogen-

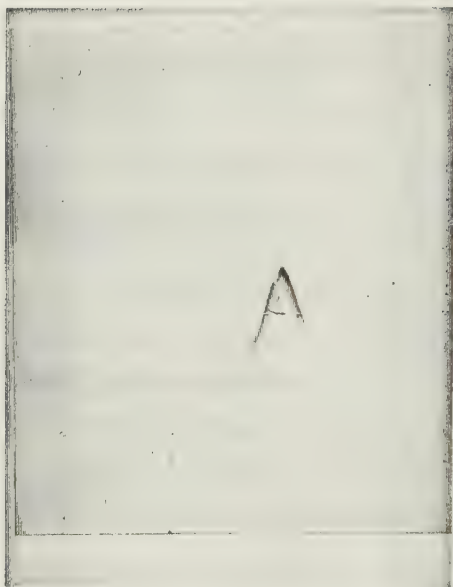
Antiserum

Zwischengel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum





b) gereinigtes Fibronektin
(290 $\mu\text{g/ml}$) +

Fibrinogen (300 $\mu\text{g/ml}$)

angegossenes Gel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum

Zwischengel:

1% Fibrinogen-

Antiserum

c) gereinigtes Fibronektin

(290 $\mu\text{g/ml}$) +

Fibrinogen (300 $\mu\text{g/ml}$) +

100 IE/ml Heparin

angegossenes Gel:

0,75% Fibrinogen-

Antiserum

Zwischengel:

1,5% Fibronektin-

Antiserum

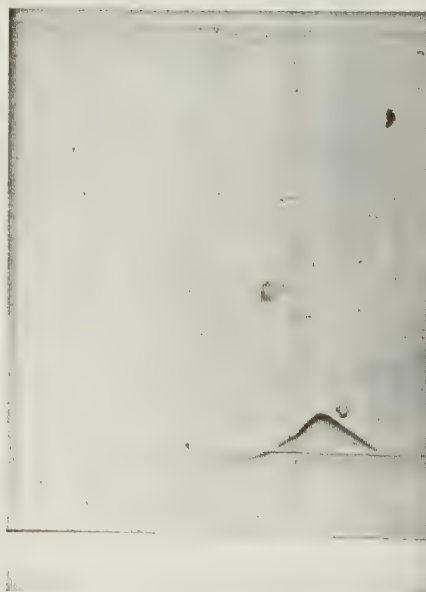


Abb.16: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Plasma-
fibronektin - Intermediärgeltechnik

1% Agarose, Puffer: Tris-Tricine, 5 μl Probe

1.Dimension: 7 V/cm, 3 h Laufzeit

2.Dimension: 3 V/cm, 14 h Laufzeit

1.4. Immundiffusion nach Mancini

1.4.1. Vergleich: Selbstgefertigte Gele - LC-Partigenplatten

Die radiale Immundiffusion nach Mancini wurde sowohl mit selbstgefertigten Gelen (Abb.17 a) als auch mit kommerziell erhältlichen Diffusionsplatten (LC-Partigen; Abb.17 b) durchgeführt. Beide Gelsysteme lieferten weitgehend übereinstimmende Ergebnisse. Aufgrund der besseren Standardisierung der LC-Partigenplatten wurden diese für die exakte Quantifizierung der Fibronektinkonzentration in den Plasmaproben der Hauptversuche verwendet.

a) Selbstgefertigte Gele

Puffer: Ouchterlony

5 µl Probe

1% Agarose mit

1% Antiserum gegen

Fibronektin

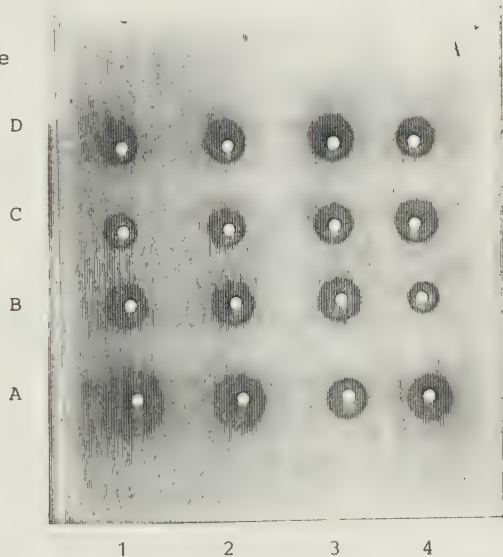


Abb.17 a: Radiale Immundiffusion nach Mancini mit Plasmafibronektin

Auftragsstelle A 1-3: Proteinstandardplasma

(295; 147,5; 73,75 µg/ml)

übrige Auftragsstellen: Patientenplasmen (1:3 verd.)

b) LC-Partigenplatten

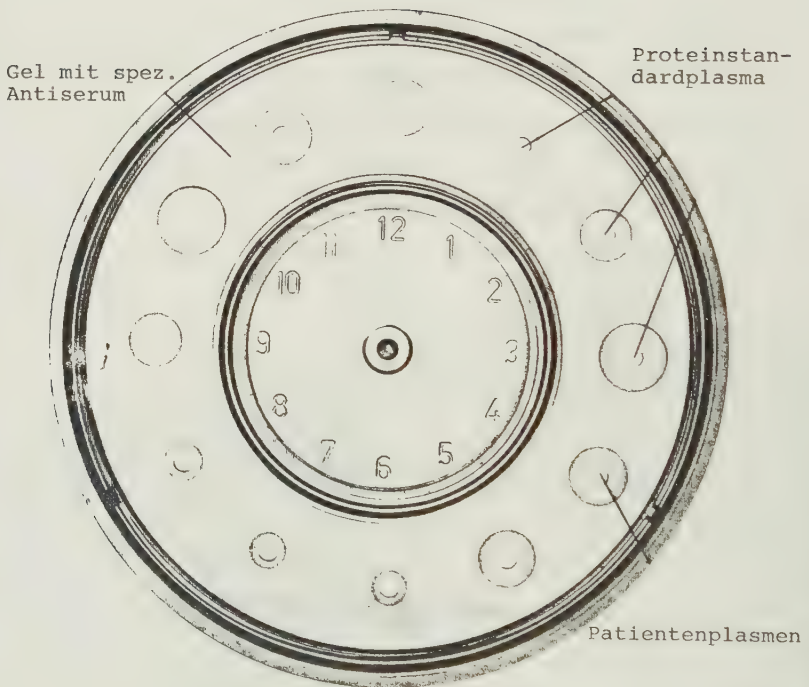


Abb.17 b: Radiale Immundiffusion nach Mancini mit Plasma-
fibronectin

20 μ l Probe

Auftragsstelle: 1-3: Proteinstandardplasma

(295; 147,5; 73,75 μ g/ml)

4-12: Patientenplasmen (1:3 verd.)

1.4.2. Untersuchungen zur Präzision

Präzision in der Serie

Im Gegensatz zum Elektroimmunoassay wurden die Normalplasmaproben unverdünnt aufgetragen; ansonsten waren Art und Anzahl der verwendeten Proben identisch (siehe Abschnitt C.1.1.5.).

In Tabelle 3 sind die Meßwerte pro Untersuchungstag mit den jeweils berechneten Präzisionsparametern dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die Einzelmeßwerte für das Fibronektin bei 10-facher Messung mittels der Immundiffusion mit Variationskoeffizienten von 3,9% und 10,5% um die Mittelwerte streuen.

Tabelle 3:

Meßergebnisse für die Präzision in der Serie der Immundiffusion an 2 Tagen (I,II) in zwei verschiedenen Normalplasmen (A,B) sowie berechnete Präzisionsparameter.

Untersuchungstag	I	II
Normalplasma	A	B
Einzelmeßwerte	284 238 249 314 289 237 234 241 249 276	334 300 312 298 330 330 321 312 309 318
Mittelwert $\bar{x}$	261,1	316,4
Standardabweichung S	27,6	12,5
Standardabweichung von $\bar{x}$ (=SEM)	8,7	3,9
Variationskoeffizient %	10,5	3,9

Präzision von Tag zu Tag

Die Untersuchung entsprach der Messung der Präzision des Elektroimmunoassays, wobei aber hier die Proben unverdünnt eingesetzt wurden.

Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, lagen die Variationskoeffizienten bei 9,9% bzw. 8,0%.

Tabelle 4:

Meßergebnisse für die Präzision von Tag zu Tag der quantitativen Proteinbestimmung mit Immundiffusionsplatten sowie berechnete Präzisionsparameter.

	Einzelmeßwerte (Doppelproben)	
Untersuchungstag 1	274	289
2	244	277
3	278	279
4	302	298
5	280	240
6	233	232
7	239	258
8	254	295
9	294	290
10	230	270
Mittelwert $\bar{x}$	262,8	272,8
Standardabweichung S	26,1	22,8
Standardabweichung von $\bar{x}$ (=SEM)	8,2	7,2
Variationskoeffizient %	9,9	8,3

1.5. Turbidimetrischer Immunoassay

1.5.1. Eichkurve

Wie aus Abb.18 zu ersehen ist, ergibt sich bei Verwendung der kommerziellen Standardproben eine biphasische Eichkurve mit einem linearen Teil bis zu einer Fibronektinkonzentration von 350 $\mu\text{g/ml}$; bei höheren Konzentrationen weist der Kurvenverlauf auf einen Sättigungscharakter des Testsystems hin. Zur Ermittlung der Fibronektinwerte in den Plasmaproben wurde nur der lineare Teil der Eichkurve verwendet.

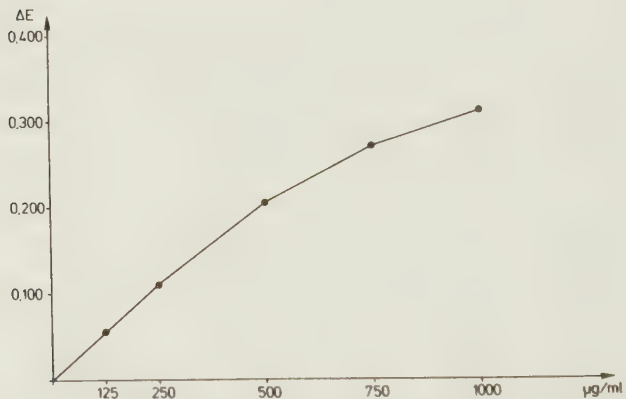


Abb.18: Eichkurve zur Ermittlung der Fibronektinkonzentration mittels des turbidimetrischen Immunoassays

1.5.2. Untersuchungen zur Präzision

Präzision in der Serie

Beim turbidimetrischen Immunoassay wurden die Untersuchungen der Präzision in der Serie anhand des im Kit mit-

gelieferten Kontrollplasmas ausgeführt. Bei 10-facher Messung des Kontrollplasmas ergab sich im turbidimetrischen Test ein Mittelwert von 174,5 $\mu\text{g/ml}$ und eine Standardabweichung vom Mittelwert von 2,0 $\mu\text{g/ml}$; der Variationskoeffizient betrug 3,7%. Der Konzentrationsbereich für dieses Plasma liegt laut Packungsbeilage zwischen 135 und 205 $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle 5:

Meßergebnisse für die Präzision in der Serie des turbidimetrischen Testes an einem Tag anhand eines Kontrollplasmas sowie berechnete Präzisionsparameter.

	Einzelmeßwerte
Kontrollplasma	178
	172
	165
	180
	174
	182
	170
	169
	185
	170
Mittelwert $\bar{x}$	174,5
Standardabweichung S	6,4
Standardabweichung von $\bar{x}$ (=SEM)	2,0
Variationskoeffizient %	3,7

Präzision von Tag zu Tag

Die Anzahl der Bestimmungen zur Präzision von Tag zu Tag mußte aus Gründen der Haltbarkeit des Antiserum-Puffers auf 7 Tage beschränkt werden. Tabelle 6 zeigt für diese Meßwerte einen Variationskoeffizienten von 3,6%, sowie eine Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) von $\pm 2,3 \mu\text{g/ml}$.

Tabelle 6:

Meßergebnisse für die Präzision von Tag zu Tag der quantitativen Proteinbestimmung mit dem turbidimetrischen Assay sowie berechnete Präzisionsparameter.

	Einzelmeßwerte
Kontrollplasma	168 174 180 164 175 182 173
Mittelwert $\bar{x}$	173,7
Standardabweichung S	6,3
Standardabweichung von $\bar{x}$ (=SEM)	2,3
Variationskoeffizient %	3,6

1.6. Testbedingungen für die Hauptversuche:

Aus den in den Vorversuchen dargestellten Ergebnissen resultieren als die unserer Meinung nach besten Testbedingungen für die folgenden Hauptversuche:

Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell:

Puffer:	Tris-Tricine
Standard:	Proteinstandardplasma
Standardkonzentration:	125; 100; 75; 50; 25 µg/ml
Probenverdünnung:	1:3
Antiserumkonzentration:	1,2%
Elektrophoreselaufzeit:	18 h

Immundiffusion nach Mancini auf LC-Partigenplatten:

Standard:	Proteinstandardplasma
Standardkonzentration:	295; 147,5; 73,75 µg/ml
Probenverdünnung:	unverdünnt

Turbidimetrischer Immunoassay:

Bei diesem Test tauchten Schwierigkeiten im genauen Pipettieren der geringen Probenmengen von 0,01 ml und den streng einzuhaltenden Zeitintervallen auf. Aus diesem Grund schien uns, im Gegensatz zu dem von der Firma Boehringer vorgeschlagenen Pipettierschema, eine Vorgabe der Probe anstatt des Reaktionsgemisches im Hinblick auf die Zeitabhängigkeit des Testes günstiger (siehe B.2.2.3. "Methoden").

2. Hauptversuche

2.1 Fibronektinkonzentration bei extrakorporaler Zirkulation

Im Folgenden wurden die Plasmafibronektinkonzentrationen von Patienten (20 pro Gruppe; Gruppeneinteilung siehe B.1.1."Untersuchungsmaterial"), denen ein 2- bis 4-facher Aorto-Coronarer-Bypass implantiert wurde, mit der Rocket-Immunelektrophorese, der Immundiffusion auf LC-Partigenplatten und dem turbidimetrischen Immunoassay gemessen. Pro Patient wurden 10 Plasmaproben vor [0,1,2], während [3,4,5] und nach [6,7,8,9] der Operation am offenen Herzen untersucht.

2.1.1. Aprotinin - Gruppe

Tabelle 7 zeigt die anhand der drei verschiedenen Meßmethoden errechneten Mittelwerte $\bar{x}$ sowie deren Standardabweichungen (SEM) der Plasmakonzentrationen an Fibronektin.

Tabelle 7:

Gehalt an Plasmafibronektin bei Patienten mit extra-korporaler Zirkulation unter Aprotinintherapie.

Der Schlüssel für die Zeitpunkte der Blutentnahme ist in B.1.1."Untersuchungsmaterial" wiedergegeben.

Zeitpunkt der Blut- entnahme	Immunelektro- phorese		Immun- diffusion		Turbidimetr. Assay	
	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	$\pm$ SEM	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	$\pm$ SEM	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	$\pm$ SEM
0	383	26,8	328	25,5	321	23,1
1	330	27,5	272	18,6	246	19,9
2	286	17,7	246	19,8	246	19,9
3	248	12,7	204	11,3	208	10,8
4	147	6,8	122	5,3	99	6,1
5	153	6,0	126	6,7	117	7,4
6	213	8,5	177	6,8	171	7,5
7	208	7,4	191	7,5	181	6,0
8	224	12,1	201	18,4	204	18,0
9	229	10,3	215	17,6	219	14,5

Die Änderungen der Plasmakonzentration wiesen bei allen drei Meßmethoden vergleichbare Verläufe auf (Abb.19).

Der Abfall des Plasmafibronektins nahm von der ersten (1 bis 2 Tage vor der Operation) bis zur vierten Blutabnahme (15 Minuten nach Anfang des totalen Bypasses)

einen nahezu linearen Verlauf. Die zu diesem Zeitpunkt gemessenen Werte betrugen, je nach Meßmethode, nur noch 31 bis 38% der Ausgangskonzentration. Anschließend konnte bis 3 Tage nach der Operation ein Anstieg des Fibronektins bis auf 68% des Anfangswertes verzeichnet werden. Auffälligerweise zeigten alle mittels der Rocket-Immunelektrophorese gemessenen Proben höhere Werte, wobei der Unterschied von ca 20% vor der Operation auf etwa 5%, 3 Tage nach der Operation, abnahm. Die mit Hilfe des turbidimetrischen Assays ermittelten Konzentrationen entsprachen denen der Immundiffusion und lagen nur während des Bypasses geringfügig niedriger.

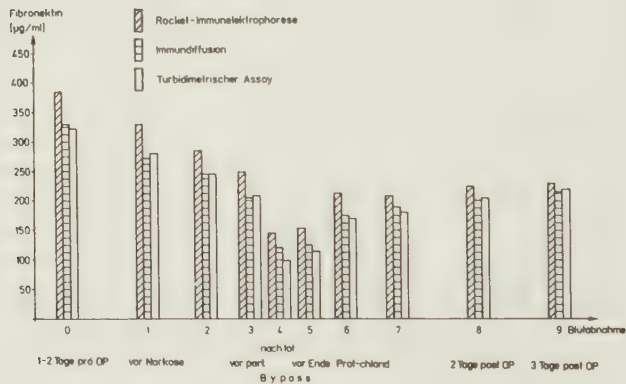


Abb.19: Gehalt an Plasmafibronektin bei Patienten mit extrakorporaler Zirkulation unter Aprotinintherapie.

2.1.2. Placebo - Gruppe

Aus Tabelle 8 sind die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM) des Plasmagehaltes an Fibronectin im Verlauf der Beobachtungszeit ersichtlich.

Tabelle 8:

Gehalt an Plasmafibronektin bei Patienten mit extrakorporaler Zirkulation unter Placebogabe.

Der Schlüssel für die Zeitpunkte der Blutabnahme ist in B.1.1. "Untersuchungsmaterial" wiedergegeben.

Zeitpunkt der Blut- entnahme	Immunoelektro- phorese		Immun- diffusion		Turbidimetr. Assay	
	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	+ SEM	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	+ SEM	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	+ SEM
0	397	30,5	314	24,7	319	22,4
1	351	23,0	307	16,4	306	19,9
2	297	16,7	264	16,1	257	22,1
3	257	16,7	243	23,0	227	22,4
4	146	11,5	112	7,6	94	6,9
5	149	11,1	115	12,3	98	12,1
6	194	10,4	164	17,2	147	17,0
7	202	11,8	177	13,7	170	12,7
8	208	12,1	186	15,3	171	15,5
9	244	16,1	203	19,5	184	19,6

Bei der Placebogruppe konnte ebenfalls ein Abfall der Fibronektinkonzentration bis 15 Minuten nach Beginn des totalen Bypasses auf 39,7% (turbidimetrischer Test) bzw. 36,7 und 35,6% des Ausgangswertes bei der Immun-Elektrophorese und der Immundiffusion festgestellt werden. Der Wiederanstieg des gemessenen Plasmaproteins 3 Tage nach der Operation erfolgte auf 58 bis 64% des präoperativen Wertes. Die Konzentrationsverläufe, dargestellt in Abb.20, ähneln denen der Aprotiningruppe, wobei auch hier die anhand der Rocket-Immunelektrophorese ermittelten Werte durchschnittlich 20% höher lagen.

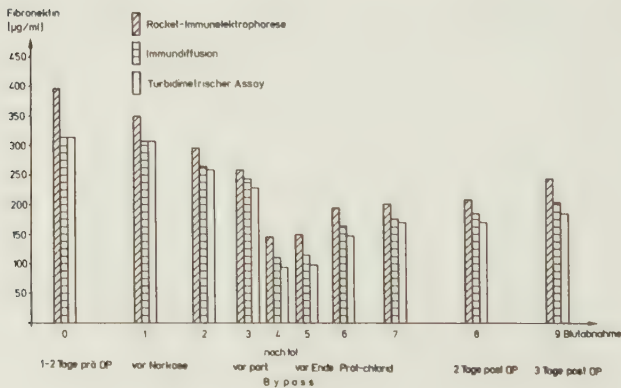


Abb.20: Gehalt an Plasmafibronektin bei Patienten mit extrakorporaler Zirkulation unter Placebogabe.

2.1.3. C1-Inhibitor - Gruppe

Die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM) der Fibronektinkonzentration der C1-Inhibitorgruppe sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9:

Gehalt an Plasmafibronektin bei Patienten mit extrakorporaler Zirkulation unter C1-Inhibitorthherapie.

Der Schlüssel für die Zeitpunkte der Blutentnahme ist in B.1.1. "Untersuchungsmaterial" wiedergegeben.

Zeitpunkt der Blut- entnahme	Immunoelektro- phorese		Immun- diffusion		Turbidimetr. Assay	
	$\bar{x}$	$\pm$ SEM	$\bar{x}$	$\pm$ SEM	$\bar{x}$	$\pm$ SEM
	$\mu\text{g/ml}$		$\mu\text{g/ml}$		$\mu\text{g/ml}$	
0	418	34,0	386	27,5	364	32,8
1	342	19,7	346	19,6	340	21,3
2	308	18,6	278	24,4	291	23,3
3	270	18,6	255	21,8	265	24,1
4	152	12,2	143	21,3	128	20,3
5	152	11,4	136	16,5	129	17,6
6	204	16,0	187	15,1	157	9,5
7	197	11,2	182	17,1	169	16,0
8	215	12,9	182	10,0	181	13,0
9	254	24,7	218	23,8	206	23,7

Die mit dem humanen C1-Inhibitor-Präparat behandelte Patientengruppe (Abb.21) zeigte einen der Aprotinin- bzw. Placebo-Gruppe identischen Konzentrationsverlauf. Die niedrigsten Fibronektinwerte (35-37% der Ausgangswerte) waren ebenfalls 15 Minuten nach Beginn des totalen Bypasses zu verzeichnen. 3 Tage nach der Operation stieg die Konzentration des Plasmaproteins wieder auf 56 bis 60% des präoperativ gemessenen Wertes an. Obwohl sich die Fibronektinkonzentrationen, die anhand der drei Meßmethoden ermittelt wurden, bei diesem Patientenkollektiv am wenigsten voneinander unterschieden, lagen auch hier die turbidimetrisch bestimmten Werte etwas niedriger.

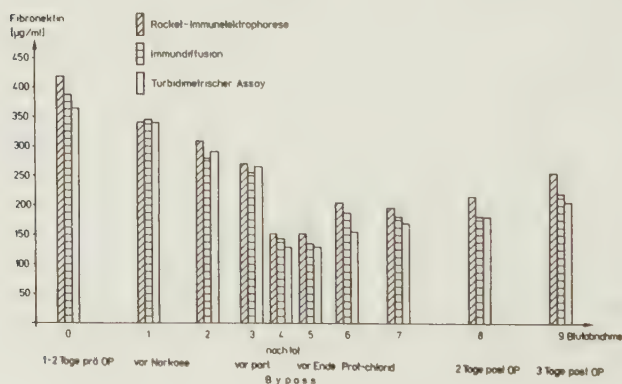


Abb.21: Gehalt an Plasmafibronektin bei Patienten mit extrakorporaler Zirkulation unter C1-Inhibitortherapie.

2.2. Korrelationsberechnungen

Da sich die Konzentrationen des Plasmafibronektins, abhängig von der verwendeten Bestimmungsmethode offensichtlich voneinander unterschieden, wollten wir in diesem Abschnitt der Arbeit die Vergleichbarkeit der Testsysteme, gesondert für jedes Patientenkollektiv, durch Korrelationsberechnungen eindeutiger charakterisieren. Hierfür wurden jeweils zwei Methoden miteinander verglichen, und zwar anhand von 75 zufällig ausgewählten Einzelwerten pro Methode. Mittels der bekannten Rechenverfahren wurden die Korrelationskoeffizienten r und die Regressionsgeraden berechnet und eine graphische Darstellung in Form einer Punktwolke vorgenommen.

2.2.1. Aprotinin-Gruppe

Stark positive Korrelationen wurden sowohl zwischen der Immunelektrophorese (IE) nach Laurell und der Immundiffusion (ID), der Immunelektrophorese und dem turbidimetrischen Test (TA), als auch zwischen der Immundiffusion und dem turbidimetrischen Test errechnet. Anhand der Dichte der einzelnen Punkte entlang der Regressionsgeraden in den Abbildungen 22-24 zeigt sich ebenfalls der gute lineare Zusammenhang der Meßmethoden untereinander. Die einzelnen Korrelationskoeffizienten betragen bei

$n = 75$ Meßwerten:

r (IE/ID)	$= 0,93$
r (IE/TA)	$= 0,92$
r (ID/TA)	$= 0,93$

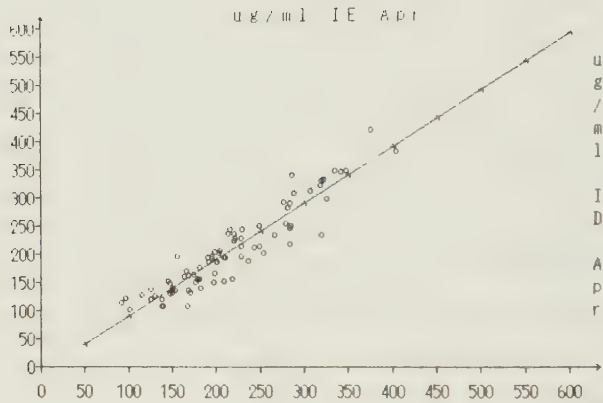


Abb.22: Korrelation der mittels der quantitativen Immunelektrophorese nach Laurell gemessenen 75 Fibronektinwerte (Ordinate) mit den anhand der Immundiffusion ermittelten (Abszisse). Dargestellt sind Punktwolke der Meßwerte und Regressionsgerade.

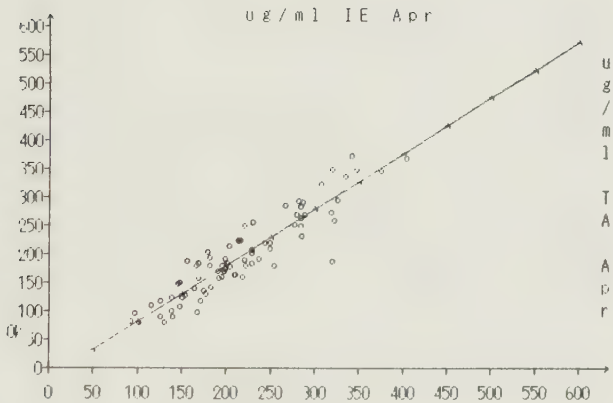


Abb.23: Korrelation der mittels der quantitativen Immun-
elektrophorese nach Laurell gemessenen 75 Fibro-
nektinwerte (Ordinate) mit den anhand des turbi-
dimetrischen Testes ermittelten (Abszisse).
Dargestellt sind Punktwolke der Meßwerte und
Regressionsgerade.

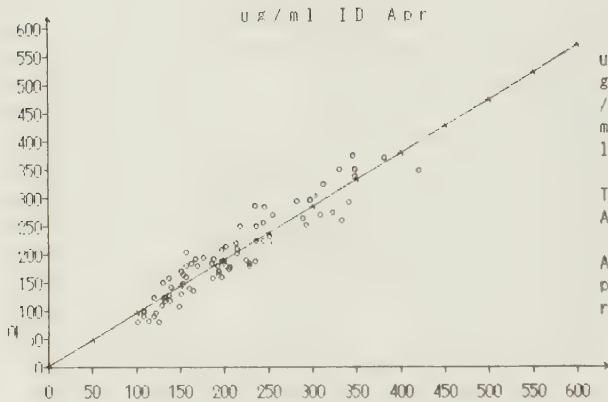


Abb.24: Korrelation der mittels der quantitativen Immundiffusion gemessenen 75 Fibronektinwerte (Ordinate) mit den anhand des turbidimetrischen Testes ermittelten (Abszisse).

Dargestellt sind Punktwolke der Meßwerte und Regressionsgerade.

2.2.2. Placebo-Gruppe

Auch in dieser Gruppe ist die Korrelation zwischen der Immunelektrophorese (IE) und der Immundiffusion (ID) einerseits sowie der Immundiffusion und dem turbidimetrischen Test (TA) gleich hoch (Abb.25 mit 27).

Auffälligerweise war jedoch die beste Korrelation zwischen der Immundiffusion und dem turbidimetrischen Test zu verzeichnen.

Die einzelnen Korrelationskoeffizienten betrugen bei $n = 75$ Meßwerten:

$$r \text{ (IE/ID)} = 0,94$$

$$r \text{ (IE/TA)} = 0,94$$

$$r \text{ (ID/TA)} = 0,97$$

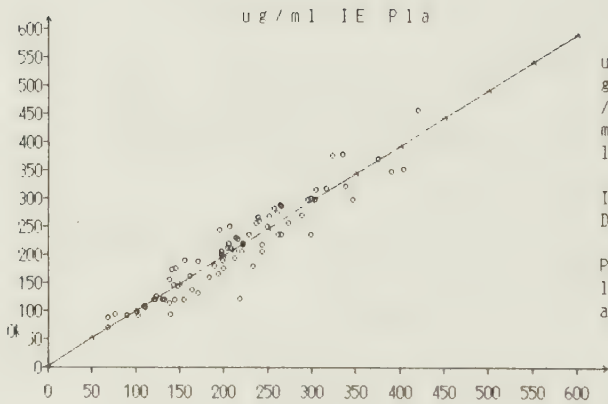


Abb.25: Korrelation der mittels der quantitativen Immunelektrophorese nach Laurell gemessenen 75 Fibronektinwerte (Ordinate) mit den anhand der Immundiffusion ermittelten (Abszisse). Dargestellt sind Punktwolke der Meßwerte und Regressionsgerade.

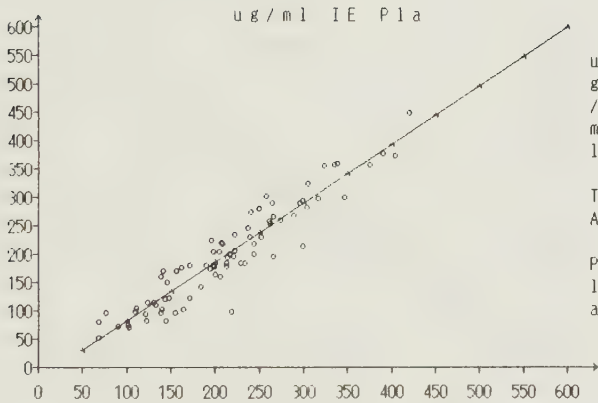


Abb.26: Korrelation der mittels der quantitativen Immunelektrophorese nach Laurell gemessenen 75 Fibronektinwerte (Ordinate) mit den anhand des turbidimetrischen Testes ermittelten (Abszisse). Dargestellt sind Punktelcke der Meßwerte und Regressionsgerade.

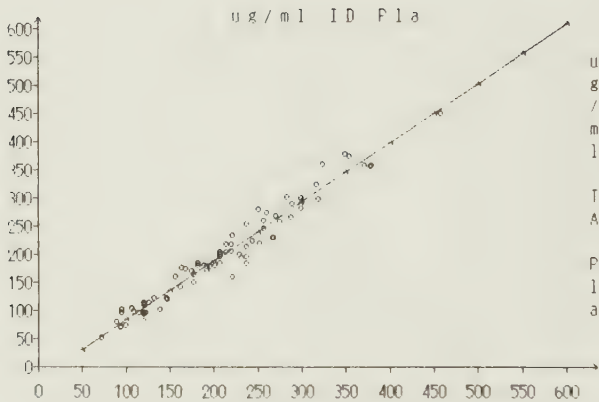


Abb.27: Korrelation der mittels der quantitativen Immun-
diffusion gemessenen 75 Fibronektinwerte (Ordi-
nate) mit den anhand des turbidimetrischen Testes
ermittelten (Abszisse).
Dargestellt sind Punktwolke der Meßwerte und
Regressionsgerade.

2.2.3. C1-Inhibitor-Gruppe

Die aus 75 Einzelmessungen ermittelten Korrelationen (Abb.28-30) zeigten in dieser Patientengruppe die größten Unterschiede. Die niedrigste Korrelation ergab sich für die Immunelektrophorese (IE) und den turbidimetrischen Test (TA). Die positivste Korrelation errechnete sich für den Vergleich der Immundiffusion (ID) mit dem turbidimetrischen Test.

Die einzelnen Korrelationskoeffizienten betrugen bei
n = 75 Meßwerten:

$$r \text{ (IE/ID)} = 0,93$$

$$r \text{ (IE/TA)} = 0,91$$

$$r \text{ (ID/TA)} = 0,96$$

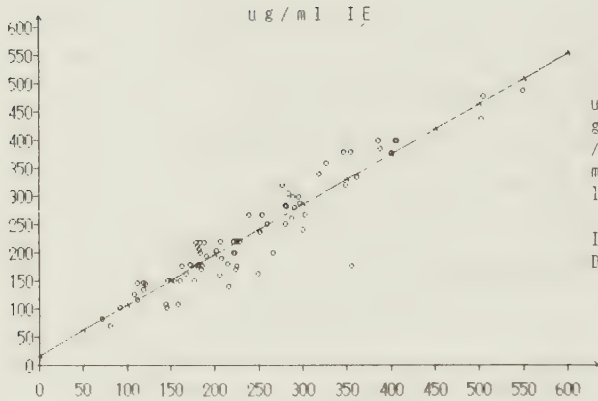


Abb.28: Korrelation der mittels der quantitativen Immun-
elektrophorese nach Laurell gemessenen 75 Fibro-
nektinwerte (Ordinate) mit den anhand der Immun-
diffusion ermittelten (Abszisse).
Dargestellt sind Punktwolke der Meßwerte und
Regressionsgerade.

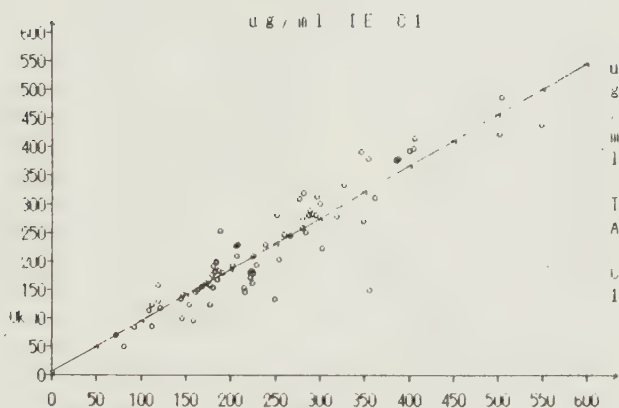


Abb.29: Korrelation der mittels der quantitativen Immunelektrophorese nach Laurell gemessenen 75 Fibronektinwerte (Ordinate) mit den anhand des turbidimetrischen Testes ermittelten (Abszisse). Dargestellt sind Punktwolke der Meßwerte und Regressionsgerade.

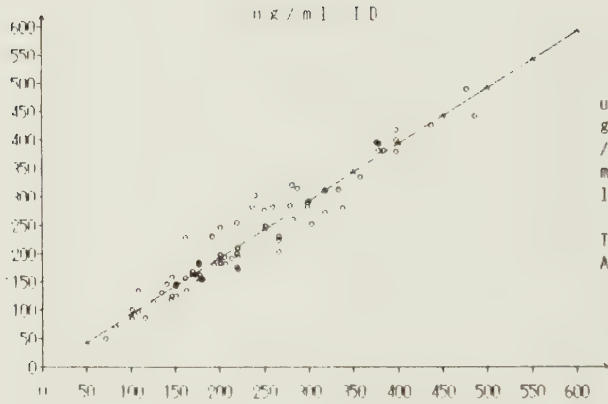


Abb.30: Korrelation der mittels der quantitativen Immundiffusion gemessenen 75 Fibronektinwerte (Ordinate) mit den anhand des turbidimetrischen Testes ermittelten (Abszisse).
Dargestellt sind Punktelwolke der Meßwerte und Regressionsgerade.

2.3. Vergleich: Gesamtprotein und Fibronektinkonzentration

Zur Unterscheidung eines tatsächlichen Verbrauches des Fibronektins von einem Dilutionseffekt, wie er bei Herzoperationen mit HLM durch verabreichte Plasmaexpander auftritt, wurden im folgenden Abschnitt das Gesamtprotein und die Fibronektinkonzentration gegenübergestellt. Hierzu wählten wir die mittels der Immundiffusion bestimmten Fibronektinwerte, da bei diesem Test bereits vom Hersteller standardisierte Bedingungen vorlagen. Die Messung der Gesamtproteinmengen wurde mit der Biuret-Methode durchgeführt. Diese Werte stellte uns freundlichweise Dr. Philapitsch, Immuno Wien zur Verfügung. Für den Vergleich wurden die entsprechenden Werte von jeweils 8 Patienten aus den einzelnen Gruppen verwendet (Tabelle 10 mit 12).

Beschreibung und Bewertung der Ergebnisse aus allen drei Gruppen werden am Ende dieses Kapitels vorgenommen.

2.3.1. Aprotinin - Gruppe

In Tabelle 10 sind die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Fibronektinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) sowie des Gesamtproteins (g/100 ml) dargestellt. Die entsprechenden Kurvenverläufe sind in Abb.31 wiedergegeben.

Tabelle 10:

Plasmafibronektinkonzentration und Gesamtprotein in der Aprotiningruppe.

Plasmaprobe		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fibro- nektin ($\mu\text{g/ml}$)	$\bar{x}$	317	266	249	206	126	133	181	196	211	220
	$\pm\text{SEM}$	24,5	20,0	25,0	15,2	6,2	6,5	7,0	9,5	24,5	21,4
Gesamt- protein ($\text{g}/100\text{ml}$)	$\bar{x}$	5,8	5,6	5,3	4,7	3,1	3,4	4,3	4,6	5,1	5,7
	$\pm\text{SEM}$	0,1	0,2	0,2	0,22	0,16	0,15	0,2	0,2	0,18	0,3

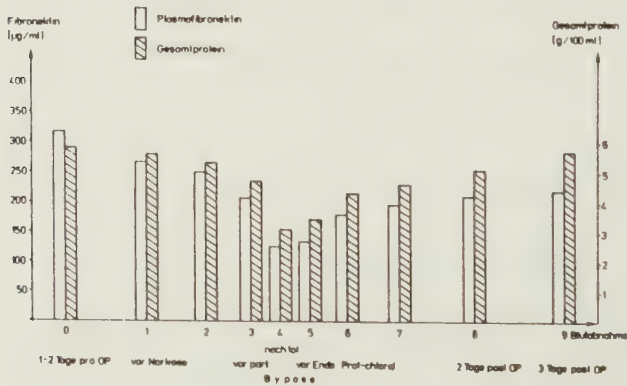


Abb.31: Konzentrationsverläufe des Fibronektins und des Gesamtproteins in der Aprotiningruppe - Patientengruppe

2.3.2. Placebo - Gruppe

In der Tabelle 11 sind die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Fibronektinkonzentrationen und des Gesamtproteins der Patienten aus der Placebogruppe aufgelistet, die zugehörigen Kurvenverläufe sind in Abb.32 dargestellt.

Tabelle 11:

Plasmafibronektinkonzentration und Gesamtprotein in der Placebogruppe.

Plasmaprobe		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fibro- nektin ($\mu\text{g/ml}$)	$\bar{x}$	314	307	264	243	112	115	164	177	186	203
	$\pm\text{SEM}$	24,7	16,4	16,1	23,0	7,6	12,3	17,2	13,7	15,3	19,5
Gesamt- protein (g/100ml)	$\bar{x}$	5,8	5,4	5,2	4,9	3,1	3,0	3,8	4,2	5,0	5,1
	$\pm\text{SEM}$	0,18	0,16	0,17	0,12	0,2	0,18	0,2	0,18	0,26	0,15

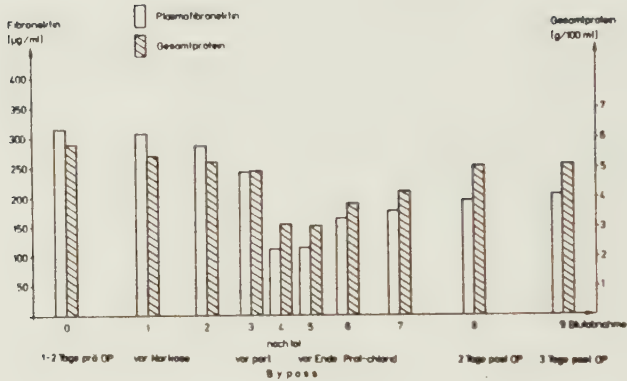


Abb.32: Konzentrationsverläufe des Fibronektins und des Gesamtproteins in der Placebogruppe - Patientengruppe II

2.3.3. C1-Inhibitor - Gruppe

Entsprechend der Aprotinin- bzw. Placebogruppe sind in Tabelle 12 die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) von Fibronektin und Gesamtprotein im Plasma der Patienten mit C1-Inhibitormedikation angegeben; die Kurvendarstellung ist aus Abb.33 ersichtlich

Tabelle 12:

Plasmafibronektinkonzentration und Gesamtprotein in der C1-Inhibitorgruppe.

Plasmaprobe		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fibro- nektin ($\mu\text{g/ml}$)	$\bar{x}$	386	346	278	255	143	136	187	182	182	218
	$\pm\text{SEM}$	27,5	19,6	24,4	21,8	21,3	16,5	15,1	17,1	10,0	23,8
Gesamt- protein (g/100ml)	$\bar{x}$	5,7	5,2	5,0	4,8	3,2	3,4	3,7	4,3	5,0	5,0
	$\pm\text{SEM}$	0,19	0,11	0,17	0,15	0,17	0,25	0,21	0,19	0,22	0,22

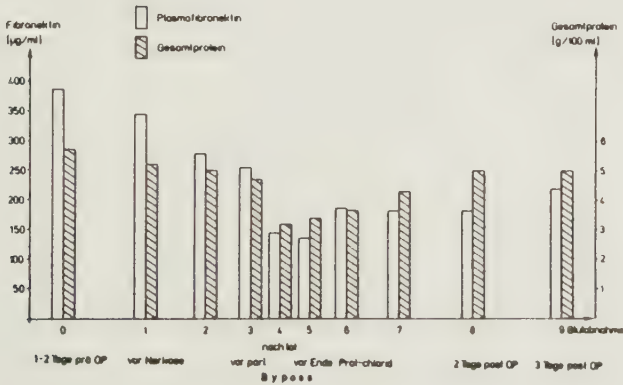


Abb.33: Konzentrationsverläufe des Fibronektins und des Gesamtproteins in der C1-Inhibitorgruppe - Patientengruppe III

Die Tabellen 10-12 und die Abbildungen 31-33 zeigen bei allen drei Patientengruppen einen nahezu parallelen Verlauf des Gesamtproteins und des Fibronektins. Das Gesamtprotein sank bis 15 Minuten nach Beginn des totalen Bypasses (Abnahme 4) auf 53 - 55% der Ausgangswerte ab. 3 Tage nach der Operation stieg es bei der Aprotinin- und C1-Inhibitorgruppe auf 87%, bei den Placebopatienten auf 98% der Ausgangskonzentrationen an. Das Verhalten des Fibronektins wurde bereits im Abschnitt C.2.1. ausführlich dargestellt.

Die Ergebnisse von C.2.1. und C.2.3. zeigen sowohl beim Fibronektin als auch beim Gesamtprotein einen Dilutionseffekt für die intraoperativen Werte, u.a. aufgrund der Füllung der HLM mit Infusionslösungen. Wie haben daher im nachfolgenden Abschnitt die korrigierten Werte von Fibronektin dargestellt.

2.3.4. Korrigierte Fibronektinwerte

Der tatsächliche Verlust an Fibronektin während und nach der extrakorporalen Zirkulation wurde durch Korrektur der in Tabelle 10-12 aufgeführten Fibronektinwerte auf die entsprechenden Proteinwerte ermittelt. Die korrigierten Fibronektinkonzentrationen wurden folgendermaßen errechnet: Der Proteingehalt des 0-Wertes wurde mit 100% angesetzt. Die Abnahme bzw. Zunahme im späteren Verlauf wurde in Prozent dieses 0-Wertes ausgedrückt. Die einzelnen Fibronektinwerte (Blutabnahme 1 mit 9) wurden anschließend auf 100% Protein korrigiert. Beispiel: Für den Patienten Nr.38 der Aprotinengruppe wurde für den 0-Wert eine Gesamtproteinmenge von 6,2 g/100 ml ermittelt. Bei der Blutabnahme 4 ergaben sich ein Gesamtprotein von 3,0 g/100 ml sowie eine Fibronektinkonzentration von 108 µg/ml. Hieraus errechnete sich für die Blutabnahme 4 der korrigierte Fibronektinwert zu 223 µg/ml ($108 \mu\text{g/ml} \times 6,2\text{g/100 ml} : 3,0 \text{ g/100 ml}$).

Aus diesen korrigierten Einzelwerten eines jeden Patienten wurden die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) bestimmt. In Tabelle 13 finden sich die auf den Proteingehalt korrigierten Mittelwerte des Plasmafibronektins (gemessen mittels Immundiffusion) der untersuchten Gruppen (Aprotinin, Placebo, C1-Inhibitor). Abb.34 zeigt die korrigierten Fibronektinwerte der drei Patientengruppen, sowie Abb.35 die Fibronektinkonzentra-

tionen in Prozent vom Ausgangswert. Der Schlüssel für die Zeitpunkte der Blutentnahmen ist in B.1.1."Untersuchungsmaterial" wiedergegeben.

Tabelle 13:

Korrigierte Plasmafibronektinkonzentrationen der Aprotinin-, Placebo- und C1-Inhibitorgruppe

Plasmaprobe	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<u>Aprotinin</u>										
Fibronektin $\bar{x}$ ($\mu\text{g/ml}$)	317	278	278	258	235	231	254	245	249	226
+ SEM	24,5	15,1	30,4	21,6	12,3	16,7	12,4	10,6	36,0	18,3
<u>Placebo</u>										
Fibronektin $\bar{x}$ ($\mu\text{g/ml}$)	314	330	295	285	209	219	253	241	215	237
+ SEM	24,7	20,0	19,0	24,4	17,3	15,6	23,4	26,1	15,4	28,2
<u>C1-Inhibitor</u>										
Fibronektin $\bar{x}$ ($\mu\text{g/ml}$)	386	377	319	301	253	237	295	241	211	237
+ SEM	27,5	25,8	32,4	29,4	35,2	32,0	30,0	24,0	12,9	23,6

Bei den Patienten, die mit dem Proteaseninhibitor Apro-
tinin behandelt wurden, konnten wir im Durchschnitt aller
Werte einen tatsächlichen Verbrauch an Fibronektin von
28% des Ausgangswertes feststellen. Die höchsten Konzen-
trationsabnahmen wurden unmittelbar vor dem Ende des By-
passes (Abnahme 4: 28% des Anfangswertes), sowie 3 Tage
nach der Operation (Abnahme 9: 29% des Anfangswertes) ge-
messen.

Bei der Placebogruppe fand sich 15 Minuten nach dem An-
fang des totalen Bypasses (Abnahme 4) eine Abnahme des
Fibronektins von 34%. 3 Tage nach der Operation stellten
wir noch einen Verbrauch von 25% des Ausgangswertes fest.
Den höchsten Verbrauch an Fibronektin zeigten die mit
humanem C1-Inhibitor therapierten Patienten. Die gering-
ste Fibronektinkonzentration war 2 Tage nach der Operation
(Abnahme 8) mit einem Verlust von 46% des präoperativen
Wertes zu verzeichnen. Unmittelbar vor dem Ende des Bypas-
ses (Abnahme 5) und 3 Tage nach der Operation betrug die
Konzentrationsabnahme des Fibronektins noch 39% des Aus-
gangswertes.

Auffälligerweise fanden sich 30 Minuten nach Protamin-
chloridgabe (Abnahme 6) bei allen drei Gruppen die
höchsten postoperativen Fibronektinwerte.

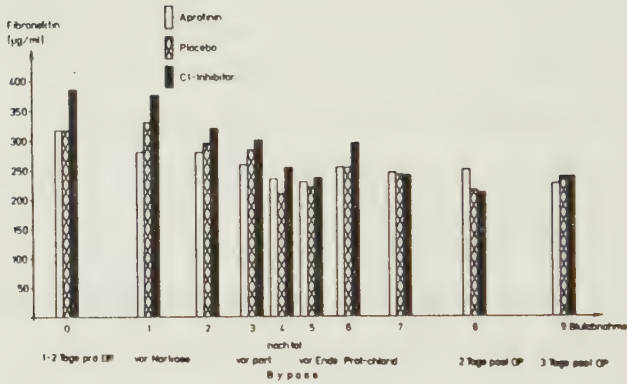


Abb.34: Konzentrationsverläufe des korrigierten Plasma-fibronektins - Patientengruppe I,II,III

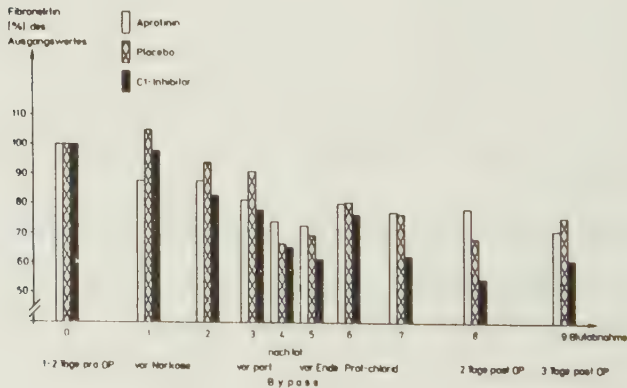


Abb.35: Konzentrationsverläufe des korrigierten Plasma-fibronektins in Prozent des Ausgangswertes

D. DISKUSSION

Im Rahmen einer Doppel-Blind-Studie über den Einfluß i.v. applizierter Proteinaseinhibitoren (Aprotinin, humanes C1-Inhibitor-Präparat) auf postoperative Blutungen in der Herzchirurgie (21,33) konnte in dieser Dissertation der Konzentrationsverlauf des Plasmaproteins Fibronektin bei extrakorporaler Zirkulation ohne und mit Proteinaseinhibitormedikation untersucht werden. Letzteres war um so interessanter, da aufgrund von in vitro- und in vivo-Untersuchungen der Arbeitsgruppe Saba (48,50) angenommen werden darf, daß der Fibronektinverlust bei großen thorakalen und abdominalen Operationen nicht allein durch eine Ablagerung von Fibronektin in intravasale Thromben und einen Verbrauch als nichtspezifisches Opsonin hervorgerufen wird, sondern daß das Protein auch durch eine direkte Proteolyse über exzessiv freigesetzte Proteasen zerstört wird.

Evaluierung der Nachweismethoden für Plasmafibronektin:

Zur Messung der Fibronektinkonzentration im Plasma bieten sich zahlreiche Methoden an.

Im Gegensatz zu den semiquantitativen Nachweisverfahren durch Immunfluoreszenz oder durch elektrophoretische Auftrennung mit nachfolgender Densitometrie zeigen quantitative immunologische Tests wie die Rocket-

immunelektrophorese nach Laurell (24), die radiale Immundiffusion mit LC-Partigenplatten (25), der Radioimmunoassay (3), der Enzymimmunoassay (50) und die erst kürzlich entwickelte Lasernephelometrie (34) sowie der turbidimetrische Immunotest (48) eine hohe analytische Zuverlässigkeit.

Im Hinblick auf den möglichen Einsatz des Fibronektinnachweises in der klinischen Routinediagnostik beschränkten wir uns in dieser Arbeit auf die Überprüfung der Immunelektrophorese nach Laurell, der radialen Immundiffusion und des turbidimetrischen Immunoassays. Will man eine exakte Interpretation der klinischen Resultate vornehmen, müssen die Ergebnisse in Relation zum Einfluß verschiedener Faktoren auf die Fibronektinkonzentration gesetzt werden.

Alle drei Testmethoden haben den Nachteil, daß das gesamte Fibronektin ohne Berücksichtigung seiner tatsächlichen Aktivität gemessen wird. Das bedeutet, daß auch noch Spaltprodukte des Moleküls erfaßt werden, die bereits die spezifische Opsoninfähigkeit verloren haben und auf diese Weise zu hohe Konzentrationen nachgewiesen werden.

In unseren Vorversuchen zeigte sich durch Fibrinogen eine Erniedrigung der erfaßten Fibronektinmenge. Dies führt zu der Annahme, daß Fibrinogen-Fibronektin-Komplexe entstehen, die eine Aktivierung der Clearance des retikuloendothelialen Systems und somit einen ver-

stärkten Fibronektinverbrauch verursachen.

Eine unsachgemäße Probenvorbereitung kann überdies zu stark streuenden Fibronektinwerten führen. Unserer Meinung nach sollten Plasmen, sofern sie nicht sofort getestet werden, bei mindestens -20°C portioniert tiefgefroren und möglichst nur einmal bei $+37^{\circ}\text{C}$ aufgetaut werden. Für die Immunelektrophorese brachten Verdünnungen von 1:3 mit 0,9%-iger Kochsalzlösung, und für die Immundiffusion bzw. den turbidimetrischen Test unverdünnte Plasmen die besten Ergebnisse.

Hinsichtlich der Probenvorbereitung und dem Einfluß verschiedener Störfaktoren verhielten sich die drei Meßmethoden gleich. Die Möglichkeiten systematischer Fehler scheinen bei allen Tests identisch und vernachlässigbar klein.

Korrelationskoeffizienten von über 0,91 beim Vergleich der einzelnen Verfahren miteinander können als positiver Hinweis darauf gewertet werden, daß die mit den verschiedenen Methoden erzielten Ergebnisse sehr gut übereinstimmen. Beim turbidimetrischen Test tauchten gewisse Schwierigkeiten in bezug auf genaues Pipettieren (0,01 ml) innerhalb streng einzuhaltender Zeitintervalle auf. Die Änderung des von der Firma Boehringer vorgeschlagenen Pipettierschemas entsprechend B.2.3. ergab einen günstigeren Testablauf. Hinsichtlich der Meßgenauigkeit bei Mehrfachanalysen (Präzision in der Serie) wies der Test mit einem Variationskoeffizienten

von 3,7% die geringste Meßwertstreuung auf.

Im Vergleich dazu zeigte die Immunelektrophorese nach Laurell mit Variationskoeffizienten von 5,7 - 7,2% eine deutlich schlechtere Präzision.

Bei der Immundiffusion erzielten wir mit Variationskoeffizienten von 3,9 - 10,5% die größten Schwankungen der Meßwerte. In den Untersuchungen der Präzision von Tag zu Tag wurden ähnliche Präzisionsparameter ermittelt. Auch hier fiel die Immundiffusion mit Streuungen von 8 - 9% um den Mittelwert deutlich aus dem Rahmen. Dies beruht möglicherweise auf der Tatsache, daß die Präzipitatringe unscharf begrenzt sind, und daher eine Ablesungenauigkeit entsteht, die sich durch die anschließend notwendige Quadrierung der Durchmesser noch verstärkt.

Heparin: Therapie-bedingte Einflüsse auf Plasmafibronektin:

Durch Heparinisierung versucht man der intravasalen Gerinnung als Folge von Endothelschädigungen größerer Gefäßbezirke, Liberierung thromboplastischen Materials bei Zelluntergang und Hypozirkulation vorzubeugen.

Da jedoch Interaktionen zwischen Heparin und Fibronektin bestehen (14,15), könnte dies einen Teil des Plasmaproteins derart maskieren, daß es mit immunologischen Methoden nicht mehr vollständig erfaßt werden kann. In unseren Vorversuchen konnten wir nachweisen, daß bei Zugabe von Heparin zu einem Proteinstandardplasma in der Rocket-

Immunelektrophorese, in der Immundiffusion und im turbidimetrischen Test eine Abnahme der gemessenen Fibronektinkonzentration feststellbar war, während in der zweidimensionalen Immunelektrophorese ein zusätzlicher Peak an der Auftragsstelle zu verzeichnen war.

Für den verminderten Nachweis von Fibronektin als Folge eines Fibronektin-Heparin-Komplexes spricht auch, daß in der klinischen Studie bei allen drei Patientengruppen ein Ansteigen von Fibronektin nach Heparinneutralisation mit Protaminchlorid beobachtet werden konnte. Trotz der Empfehlung, Heparin- und EDTA-freie Proben zu verwenden, kann davon ausgegangen werden, daß die in dieser Studie gemessenen Werte vergleichbar sind, weil alle Patienten gleiche Mengen Heparin erhielten. Da eine Heparinisierung im Augenblick zu den gebräuchlichsten klinischen Therapieverfahren bei der Thromboseprophylaxe zählt, und somit die meisten zu testenden Plasmen heparinhaltig sein dürften, sollte der Einfluß der vorliegenden Heparinkonzentration auf den Nachweis der Fibronektinmenge jedoch in entsprechenden in vitro-Studien jeweils gesondert überprüft werden.

Dilution und Proteinaseinhibitoren: Betrachtet man die Fibronektinwerte während und nach der Operation, so ergibt sich ein Absinken des Plasmaspiegels bis auf ein Drittel der präoperativen Konzentration unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Patienten. Verantwortlich

hierfür könnten sowohl ein Verdünnungseffekt durch verabreichte Plasmaexpander, der Blutverlust während der Operation als auch der bereits angesprochene stärkere Verbrauch sein.

Bei allen Patienten lagen jedoch vergleichbare Blutverdünnungen vor, der Gesamtblutverlust war mit 657 ml in der Aprotinigruppe aber signifikant niedriger im Vergleich zur Placebo (1076 ml)- und C1-Inhibitorgruppe (941 ml). Um den tatsächlichen Verbrauch an Fibronektin zu ermitteln, korrigierten wir deshalb die Konzentration dieses Proteins gegenüber der jeweils gemessenen Gesamtproteinmenge.

Bei den mit dem humanen C1-Inhibitorpräparat behandelten Patienten fanden wir den höchsten Verbrauch an Fibronektin, allerdings auch, im Vergleich zu den beiden anderen Patientenkollektiven, die höchsten Ausgangswerte. Entsprechende Beobachtungen trafen auch auf die anderen Blutparameter zu (21,23). Die gewählte Dosierung des C1-Inhibitors scheint daher nicht ausreichend gewesen zu sein, um eine proteolytische Spaltung des Fibronektinmoleküls verhindern zu können.

Der bei der Placebogruppe festgestellte Fibronektinverbrauch läßt sich nur mit Einschränkungen interpretieren, da aufgrund der positiven Erfahrungen hinsichtlich der Wirkungen von Aprotinin auf den Gesamtverlauf der extrakorporalen Zirkulation (21,33) auch die Patienten,

bei denen postoperativ eine schwere Blutung auftrat, zusätzlich Aprotinin erhielten. Obwohl diese Gruppe keine antiproteolytische Behandlung vor Beginn des Eingriffes erhielt, fällt im Vergleich zu den C1-Inhibitorpatienten der geringe Verbrauch an Fibronektin auf. Eine Aussage darüber, ob hierfür der etwas geringere Blutverlust oder die Einzelgaben an Aprotinin verantwortlich sind, ist unseres Erachtens nicht möglich.

Die geringste Abnahme an Fibronektin, ebenso wie die geringsten Schwankungen der Konzentration im Gesamtverlauf, fanden sich bei den Patienten, die bereits prophylaktisch mit dem Proteaseninhibitor Aprotinin behandelt wurden. In der für diese Arbeit zugrunde liegenden Studie konnte nachgewiesen werden, daß Aprotinin im Vergleich zur Placebo- bzw. C1-Inhibitorgruppe einen verminderten Blutverlust und damit auch einen geringeren Transfusionsbedarf bewirkte. Mit der angewandten Aprotinindosierung gelang offensichtlich eine gewisse Stabilisierung des Hämostasepotentials durch gezielte Inhibierung von im Übermaß freigesetzten bzw. aktivierten Proteinasen wie z.B. Plasmin und Plasmakallikrein. Das deutlich verminderte Auftreten der Fibrinogenspaltprodukte D und E unter Aprotininmedikation kann als zusätzlicher Hinweis auf eine reduzierte systemische Plasminwirkung gewertet werden, wodurch auch der geringe Verbrauch an Fibronektin in der Aprotininingruppe zu erklären wäre.

Die letzten Proben wurden drei Tage postoperativ entnommen. Es zeigte sich in allen drei Patientengruppen, daß die Fibronektinkonzentrationen im Gegensatz zum Gesamtprotein noch nicht wieder die Ausgangswerte erreicht haben, sodaß ein tatsächlicher Verbrauch des Proteins im postoperativen Verlauf angenommen werden muß. Bei der C1-Inhibitorgruppe fanden sich wiederum die höchsten Abnahmen.

Geschlechtsspezifische sowie alters- und gewichtsabhängige Unterschiede in den Fibronektinwerten konnten in dieser Untersuchung vernachlässigt werden, da ausschließlich die Plasmen von Männern im Alter zwischen 40 und 60 Jahren getestet wurden.

Resümee:

Die drei verwendeten Meßmethoden (Rocket-Immunelektrophorese, radiale Immundiffusion, Turbidimetrie) sind sensitiv, reproduzierbar (VK unter 10%), spezifisch, zuverlässig, präzise und nicht invasiv.

Berücksichtigt man die für eine Immunelektrophorese (20 Stunden) bzw. Immundiffusion (3 Tage) erheblich längeren Zeiten bis zum Erhalt der Meßwerte, so bietet der schnell durchzuführende turbidimetrische Test einen großen arbeitstechnischen Vorteil, da pro Stunde ca. 15 Patientenplasmen in Doppelbestimmung gemessen werden können. Aus diesem Grund scheint eine Aufnahme dieses Testes in das Routineprogramm durchaus empfehlenswert.

Außer den positiven Erfahrungen im Hinblick auf Blutverlust und Transfusionsbedarf bei extrakorporaler Zirkulation nach prophylaktischer Aprotiningabe darf auch ein geringerer Verbrauch des Plasmafibronektins angenommen werden. Zusammen mit der Kryoglobulintherapie könnte der Proteaseninhibitor Aprotinin bei genügend hoher Dosierung in der Lage sein, einem Absinken des Fibronektinspiegels mit den daraus in der Einleitung erwähnten Komplikationen vorzubeugen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Konzentrationsverlauf des Plasmafibronektins von Patienten, denen ein aorto-coronarer Bypass implantiert wurde, untersucht. Die Einteilung der Patienten erfolgte in einer Doppel-Blind-Studie in 3 Gruppen zu je 20 Personen. Die Patientengruppe I erhielt Aprotinin, die zweite Gruppe ein Placebopräparat und Gruppe III wurde mit einem C1-Inhibitorkonzentrat behandelt. Prä-, intra- und postoperativ wurden von jedem Patienten insgesamt 10 Blutproben gesammelt und mittels der quantitativen Immundiffusion nach Mancini, der Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell und des turbidimetrischen Immunoassays gemessen. Bei allen Patienten zeigte sich ein Absinken des Plasmaspiegels auf ein Drittel der präoperativen Konzentrationen. Um eine Abnahme durch Blutverlust oder Blutverdünnung auszuschließen, wurden die Werte mit den entsprechenden Gesamtproteinmengen verglichen. Dabei ergaben sich für die Aprotinigruppe wesentlich günstigere Verhältnisse: der höchste Verbrauch an Fibronektin lag hier bei 29% des Ausgangswertes, während die Placebogruppe eine Abnahme um maximal 34% und die C1-Inhibitorgruppe um 46% zeigte.

In vitro-Tests, die zur Ergänzung und Interpretation der in vivo-Ergebnisse durchgeführt wurden, verdeut-

lichten den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Fibronektinkonzentration. Bereits eine unterschiedliche Probenvorbereitung zeigte variierende und streuende Werte. Geringere Fibronektinmengen wurden durch Zugabe von Heparin und Fibrinogen, bedingt durch eine jeweilige Komplexbildung mit Fibronektin, gemessen.

Alle drei verwendeten Methoden sind hinsichtlich der Präzision, Spezifität, Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und der Korrelation untereinander zur Routinediagnostik geeignet.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. Alitalo, K., Hovi, T., Vaheri, A.:
Fibronectin is produced by human macrophages
J. Exp. Med., 151: 607 - 613, 1980
2. Bittermann, P.B., Rennard, S.J., Adelberg, S., Crystal, R.G.:
Role of fibronectin as a growth factor for fibroblast
J. of Cell Biology, 97: 1925 - 1932, 1983
3. Blumenstock, Fr., Saba, Th.M., Weber, P., Laffin, R.:
Biochemical and immunochemical characterization
of human opsonic α_2 -SB glycoprotein: Its identity
with cold-insoluble globulin
J. Biol. Chem., 253: 4287 - 4291, 1978
4. Blumenstock, Fr., Saba, Th.M., Roccario, E., Cho, E.,
Kaplan, J.E.:
Opsonic fibronectin after trauma and particle injection
as determined by peritoneal macrophage monolayer assay
J. Reticuloendothelial Soc., 30: 61 - 71, 1981
5. Engvall, E., Ruoslahti, E.:
Binding of soluble form of fibroblast surface protein,
fibronectin to collagen
Int. J. Cancer, 20: 1 - 5, 1977

6. Eriksen, H.O., Clemmensen, J., Hansen, M.S., Ibsen, K.K.:
Plasma fibronectin concentration in normal subjects
Scand. J. clin. Lab. Invest., 42: 291 - 295, 1982
7. Foster, P.N., Bowen, M., Howdle, P.D., Losowsky, M.S.:
Low fibronectin in portal hypertension
Digestion, 28: 122 - 124, 1983
8. Gahmberg, C.G., Hakomori, S.:
Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 3329 - 3333, 1973
9. Gluud, C., Dejgaard, A., Clemmensen, J.:
Plasma fibronectin concentrations in patients with liver diseases
Scand. J. clin. Lab. Invest., 43: 533 - 537, 1983
10. Haeckel, R.:
Empfehlungen zur Anwendung statistischer Methoden beim Vergleich klinisch-chemischer Analysenverfahren
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 20: 107 - 110, 1982
11. Heine, H., Domann, M.:
Fibronectin - ein plasminsensitives Glykoprotein der Transitstrecke: Schutz durch Aprotinin
Drug Res., 34(I): 696 - 698, 1984

12. Hynes, R.O., Bye, J.M.:
Density and cell cycle dependance of cell surface
proteins in hamster fibroblast
Cell, 13: 113 - 120, 1974
13. Jaffe, E.A., Mosher, D.F.:
Synthesis of fibronectin by cultered endothelial cells
J. Exp. Med., 147: 1779 - 1791, 1978
14. Jilek, F., Hörmann, H.:
Cold-insoluble globulin (fibronectin) IV.
Affinity to soluble collagen of various types
Hoppe-Seyler's Z. Physiol., 359: 247 - 250, 1978
15. Jilek, F., Hörmann, H.:
Cold-insoluble globulin VI.
Influence of heparin and hyaluronic acid on the
binding of native collagen
Hoppe-Seyler's Z. Physiol., 360: 597 - 603, 1979
16. Jochum, M., Duswald, K.H., Dittmer, H., Fritz, H.:
Granulozytäre Elastase als lysosomales Marker-
enzym für pathobiochemische Veränderungen bei ent-
zündlichen Erkrankungen
Berichte der ÖKGC Jg 7: 53 - 59, 1984

17. Kaplan, J.E.:

The role of the reticuloendothelial system in control of hemostatic and thrombotic mechanism. In: Pathophysiology of the Reticuloendothelial System
Altura, B., Saba, T.M., eds
Raven press, New York: 111 - 120, 1981

18. Kaplan, J.E., Molnar, J., Saba, T.M., Allen, C.:

Comparative disappearance and localization of isotopically labeled opsonic protein and soluble albumin following surgical trauma
J. Reticuloendothelial Soc., 20: 375 - 382, 1976

19. Kaplan, J.E., Saba, Th.M.:

Immunoreactive serum opsonic α_2 -SB-glycoprotein as a noninvasive index of RES systemic defense after trauma
Advances in shock research, 2: 83 - 92, 1979

20. Karges, H.E., Merte, D., Heimburger, N.:

Bestimmung aktiven Fibronektins durch Präzipitation mit Heparin. In: Thromb. + Hämostaseforschung
ed. E.A. Beck
Schattauer Verlag: 387 - 388, 1984

21. Kirchhoff, P.G., Popov-Cenic, S., Hack, G., Murday, H., Fenyés, J., Schlemminger, B.:

Can Postoperative Haemorrhage in Cardiac Surgery be Prevented by Treatment with Aprotinin and C1-Inhibitor Concentrate, Respectively?
Blut 49: 161, 1984

22. Klingemann, H.G., Höfeler, H., Egbring, R.:
Fibronektin: Plasmaprotein mit zahlreichen Aufgaben
Deutsches Ärzteblatt, Ausgabe B 11: 807 - 812, 1984
23. Lanser, M.E., Saba, Th.M.:
Opsonic fibronectin deficiency and sepsis
Ann. Surg. Vol. 195/3: 340 - 345, 1982
24. Laurell, C.B.:
Electroimmunoassay
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 124: 21 - 37, 1972
25. Mancini, G., Carbonara, A.O., Hermemans, J.F.:
Immunochemical quantitation of antigens by single
radial immunodiffusion
Immunochemistry 2: 235 - 254, 1965
26. Morrison, P.R., Edsall, J.T., Miller, S.G.:
Preparation and properties of serum and plasma
proteins. XVIII. The separation of purified fibrin-
ogen from fraction I of human plasma
J. Am. Che. Soc., 70: 3103 - 3108, 1948
27. Mosesson, M.W., Umfleet, R.A.:
The cold-insoluble globulin of human plasma.
purification, primary characterization and relation-
ship of fibrinogen and other cold insoluble fraction
components
J. Biol. Chem., 254: 5728 - 5736, 1970

28. Mosher, D.F.:

Cross-linking of cold insoluble globulin by fibrin stabilizing factor

J. Biol. Chem., 250: 6614 - 6621, 1975

29. Mosher, D.F.:

Fibronectin

Hemostasis and Thrombosis, 5: 111 - 151, 1980

30. Mosher, D.F., Williams, E.M.:

Fibronectin concentration is decreased in plasma of severely ill patients with disseminated intravascular coagulation

J. Lab. Clin. Med., 91: 729 - 735, 1978

31. Mosher, D.F., Schad, P.E., Kleinmann, H.K.:

Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation factor XIII a

J. Clin. Invest., 64: 781 - 787, 1979

32. Pearlstein, E., Gold, L.J., Garcia-Pado, A.:

Fibronectin: A review of its structure and biological activity

Molec. Cell. Biochem., 29: 103 - 128, 1980

33. Popov-Cenic, S., Jochum, M., Fritz, H., Philapitsch, A., Müller, N.:

Behaviour of Thrombocytes and Plasmatic Coagulation Factors in Cardiac Surgery: Results of a Randomized Placebo-Aprotinin- and C1-Inhibitor Study

Blut 49: 160, 1984

34. Pott, G., Lohmann, S., Zündorf, P., Gerlach, U.:
Vermindertes Fibronektin im Plasma bei Patienten
mit Sepsis und Schock
Dtsch. med. Wschr., 106: 532 - 534, 1981
35. Proctor, R.A., Olbrantz, P.J., Mosher, D.F.:
Subinhibitory concentration of antibiotics after
fibronectin binding to Staphylococcus aureus
Antimicrobial agents and chemotherapy, 24/5: 823 - 826, 1983
36. Reilly, Jt., Mc Verry, B.A., Mackie, M.J.:
Fibronectin in blood products - an in vitro and in
vivo study
J. Clin. Pathol., 36: 1377 - 1381, 1983
37. Ruoslahti, E., Engvall, E.:
Immunochemical and collagen binding properties of
fibronectin
Ann. N.Y. Acad. Sci., 321: 178 - 191, 1978
38. Ruoslahti, E., Engvall, E., Haymann, E.G.:
Fibronectin: current concepts of its structure and
functions
Coll. Res., 1: 95 - 128, 1981
39. Ruoslahti, E., Vaheri, A.:
Novel human serum protein from fibroblast plasma membrane
Nature, 248: 789 - 791, 1974

40. Ruoslahti, E., Vaheri, A.:
Interaction of soluble fibroblast surface antigen
with fibrinogen and fibrin. Identity with cold-insoluble globulin of human plasma
J. Exp. Med., 141: 497 - 501, 1975
41. Ruoslahti, E., Vaheri, A., Kuusela, P., Lindner, E.:
Fibroblast surface antigen: A new serum protein
Biochim. Biophys. Acta, 322: 352 - 358, 1973
42. Saba, Th.M.:
Physiology and pathophysiology of the reticuloendothelial system
Arch. Intern. Med., 126: 1031 - 1052, 1970
43. Saba, Th.M.:
Effect of surgical trauma on the clearance and localization of blood-borne particulate matter
Surgery, 71: 675 - 685, 1972
44. Saba, Th.M.:
Reversal of plasma fibronectin deficiency in septic-injured patients by cryoprecipitate infusion.
In: Massive Transfusion in Surgery and Trauma
Alan R. Liss, Inc. (eds.): 129 - 150, 1982
45. Saba, Th.M., Blumenstock, Fr., Scovill, W.A., Bernard, H.:
Cryoprecipitate reversal of opsonic α_2 -surface binding glycoprotein deficiency in septic surgical and trauma patients
Science, 201: 622 - 624, 1978

46. Saba, Th.M., Blumenstock, Fr., Weber, P., Kaplan, J.E.:
Physiologic role for cold-insoluble globulin in
systemic host defense: Implications of its charac-
terization as the opsonic α_2 -SB glycoprotein
Ann. N.Y. Acad. Sci., 312: 43 - 55, 1978
47. Saba, Th.M., Jaffe, E.:
Plasma fibronectin (opsonic glycoprotein): Its syn-
thesis by vascular endothelial cells and role in
cardiopulmonary integrity after trauma as related
to reticuloendothelial function
Amer. J. Med., 68: 577 - 594, 1980
48. Saba, Th.M., Albert, W.H., Blumenstock, Fr., Evanega, G.,
Staehler, F., Cho, E.:
Evaluation of a rapid immunoturbidimetric assay for
opsonic fibronectin in surgical and trauma patients
J. Lab. Clin. Med., 98: 482 - 491, 1981
49. Saba, Th.M., Lanser, M.E., Dillon, B.:
Opsonic fibronectin and phagocytic defense after trauma
Handbook of shock and trauma, 1: 176 - 180, 1983
50. Saba, Th.M., Blumenstock, Fr., Shah, D.M., Kaplan, J.E.,
Cho, E., Scovill, W., Stratton, H., Newell, J.,
Gottlieb, M., Sedransk, N., Rahm, R.:
Reversal of fibronectin and opsonic deficiency in
patients: A controlled study
Ann. Surgery, 199/1: 87 - 96, 1984

51. Snyder, E.L., Mosher, D.F., Hezzey, A., Golenwsky, G.:
Effect of blood transfusion on in vivo levels of
plasma fibronectin
J. Lab. Clin. Med., 98/3: 336 - 341, 1981
52. Stathakis, N.E., Fountas, A., Tsianos, E.:
Plasma fibronectin in normal subjects and in various
disease states
J. Clin. Pathol., 34: 504 - 508, 1981
53. Vaheri, A., Ruoslahti, E.:
Disappearance of a major cell-type specific surface
glycoprotein antigen (SF) after transformation of
fibroblast by Rous sarcoma virus
Int. J. Cancer, 13: 579 - 586, 1974
54. Vaheri, A., Ruoslahti, E., Westermark, B., Pouten, J.A.:
Common cell type specific surface antigen in cultered
human glial cells and fibroblast, loss in malignant cells
J. Exp. Med., 143: 64 - 72, 1976
55. Vaheri, A., Mosher, D.F.:
High molecular weight cell surface associated glyco-
protein (fibronectin) lost in malignant transformation
Biochim. Biophys. Acta, 516: 1 - 25, 1978
56. Vaheri, A., Vartio, T., Stenmann, S., Saksela, O.,
Hedmann, K., Alitalo, K.:
Fibronectin and proteinases in tumor invasion.
In: Sträuli, P. (eds)
Raven press New York, 49 - 57, 1980

57. Wartiovaara, J., Leivo, J., Virtanen, J., Vaheri, A.:
Appearance of fibronectin during differentiation
of mouse teratocarcinoma in vitro
Nature, 272: 355 - 356, 1978
58. Webb, K.S., Lin, G.H.:
Urinary fibronectin: Potential as a biomarker in
prostatic cancer
Invest. Urol., 17: 401 - 404, 1980
59. Yamada, K.M., Weston, J.A.:
Isolation of a major cell surface glycoprotein from
fibroblast
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 3492 - 3496, 1974
60. Yamada, K.M., Olden, K.:
Fibronectin: adhesive glycoprotein of cell surface
and blood
Nature, 275: 179 - 184
61. Yamada, K.M., Kennedy, K.:
Fibroblast cellular and plasma fibronectin are similar
but not identical
J. Cell. Biol., 80: 492 - 498, 1979
62. Zazgornik, J., Graninger, W., Minar, E., Schmidt, P.,
Balcke, P., Haubenstock, A., Kopsa, H.:
Elevated plasma fibronectin levels in nephrotic syndrome
Klin. Wschr., 62: 531 - 532, 1984

Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. Fritz, Leiter der Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. M. Jochum für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit, ihre Bereitschaft zum klärenden Gespräch, sowie für immer neue Denkanstösse bei auftretenden Schwierigkeiten.

Frau Prof. Dr. Popov-Cenic vom Institut für Experimentelle Hämatologie, Bonn, danke ich für die zur Verfügung gestellten Proben, ebenso Herrn Dr. Philapitsch, Immuno Wien, für die Überlassung der Gesamtproteinmessungen.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern von Frau Dr. Jochum, Frau U. Hof und Frau C. Seidl für ihre Hilfe bei der Klärung technischer und organisatorischer Fragen und das überaus angenehme Arbeitsklima.

Nicht zuletzt danke ich Frau C. Seidl für die Unterstützung bei der endgültigen Fassung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 6.6.1956 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Heinz Schramm und seiner Ehefrau Anna-Margarete, geb. Lohmann in Würzburg geboren.

In Kitzingen besuchte ich von 1962 bis 1966 die Volksschule, ging dann an den neusprachlichen Zweig des Armin-Knab-Gymnasiums und legte dort 1975 die Reifeprüfung ab.

Vom Wintersemester 1975 bis zum Sommersemester 1977 studierte ich an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg Geologie.

Im Oktober 1977 wurde ich zum 5.Sanitätsbataillon der 12.Panzerdivision in Veitshöchheim einberufen, und nach 15 Monaten Wehrdienst im Dezember 1978 entlassen.

Anschließend leistete ich für ein halbes Jahr in einer Brauerei das für das Studium der Lebensmitteltechnologie notwendige Industriepraktikum ab.

Im Wintersemester 1979 schrieb ich mich an der TU München-Weihenstephan für dieses Studium ein und wechselte nach meiner Zulassung zum Studium der Humanmedizin nach dem ersten Teil des Vordiploms an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg über.

Seit dem Sommersemester 1981 studiere ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München, legte dort nach dem 3. Semester das Physikum ab, im Winter 1983 das 1.Staats-examen und im Wintersemester 1985 das 2.Staatsexamen. Im April 1986 beabsichtige ich den 3.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung zu absolvieren.

